



HAL
open science

Sensibilisation centrale trigéminal et interactions neurone/astrocyte dans un modèle de migraine chronique

Marine Megemont

► **To cite this version:**

Marine Megemont. Sensibilisation centrale trigéminal et interactions neurone/astrocyte dans un modèle de migraine chronique. Santé. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAS017 . tel-03897566

HAL Id: tel-03897566

<https://theses.hal.science/tel-03897566>

Submitted on 14 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT**

THESE

Présentée à Clermont-Ferrand pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

Spécialité : **NEUROSCIENCE**

Sensibilisation centrale trigéminal et interactions neurone/astrocyte dans un modèle de migraine chronique

par

Marine MEGEMONT

Co-directeurs de thèse : **Pr.Philippe Luccarini**

Dr Lénaïc Monconduit

Soutenue publiquement le 13 Décembre 2019 devant le jury composé de :

Dr REAUX - LE GOAZIGO Annabelle, Institut de la Vision, Paris	Rapporteur
Dr DARBON Patrice, INCI, Université de Strasbourg	Rapporteur
Dr. HADDJERI Nasser, SBRI, Université Lyon 1	Rapporteur
Pr. COURTEIX Christine, Neuro-Dol, Université Clermont Auvergne	Examineur
Dr. MONCONDUIT Lénaïc, Neuro-Dol, Université Clermont Auvergne	Co-directeur
Pr. LUCCARINI Philippe, Neuro-Dol, Université Clermont Auvergne	Co-directeur

Résumé :

La répétition des crises de migraine entraîne une plasticité neuronale inadaptée et conduit à la chronicisation de la maladie. La sensibilisation des réseaux de la douleur joue un rôle important dans la transition vers les formes chroniques de la migraine. Il est reconnu que les astrocytes sont activés dans le noyau spinal caudal du trijumeau (Sp5C) en réponse à une lésion du tissu périphérique et sont impliqués dans la sensibilisation centrale. Nous faisons l'hypothèse que les astrocytes et la D-Sérine, un gliotransmetteur co-agoniste des récepteurs NMDA, participent à la sensibilisation centrale sous-jacente dans un modèle de migraine induite par un donneur d'oxyde nitrique (NO) chez le rat. En combinant des approches comportementales, immunohistochimiques, et électrophysiologiques *in vivo*, notre étude a montré le rôle de l'activité des astrocytes dans l'hypersensibilité cutanée céphalique et l'activation neuronale au sein du Sp5C. L'administration systémique répétée d'isosorbide dinitrate (ISDN), donneur de NO, induit une surexpression de p-ERK et de GFAP dans le Sp5C, une allodynie céphalique mécanique persistante et une facilitation des réponses liées à l'activation des fibres C des neurones du Sp5C. Nous démontrons pour la première fois que l'application intracisternale d'acide L- α -aminoadipique (gliotoxine) et de D-Amino-Acid-Oxidase (enzyme dégradant la D-sérine) empêche l'allodynie et la sensibilisation du Sp5C. Cet effet préventif était supprimé par l'administration de D-sérine. Nos résultats suggèrent que les astrocytes contribuent à la sensibilisation centrale du trijumeau et à l'hypersensibilité cutanée céphalique qui caractérisent la progression de la migraine. Ils montrent que l'altération de l'activité des astrocytes pourrait constituer un nouvel élément clé dans les mécanismes physiopathologiques de la migraine.

Abstract :

Repeated migraine attacks are associated with maladaptive neural plasticity and lead to chronic headache. Sensitization of pain networks play an important role in the transition to the chronic forms of the disorder. It is increasingly recognized that astrocytes are activated in the spinal trigeminal nucleus caudalis (Sp5C) in response to peripheral tissue injury and are involved in central sensitization. Here, we hypothesized that astrocytes and D-Serine, an astroglial neurochemical and NMDA co-agonist, participate in the central sensitization underlying a NO-donor-induced migraine model in the rat. Combining behavioral, immunohistochemical and *in vivo* electrophysiological approaches, our study proved the contribution of astrocytes activity in cephalic cutaneous hypersensitivity and neuronal activation within the MDH. Recurrent systemic administration of isosorbide dinitrate (ISDN), a nitric oxide donor, induce an overexpression of p-ERK and GFAP in Sp5C, a persistent cephalic mechanical allodynia and facilitated C-fiber-electrically-evoked responses of Sp5C neurons. We demonstrate for first time that intracisternal application of L- α -Aminoadipic acid (gliotoxin) and D-Amino-Acid-Oxidase (D-Serine degrading enzyme) prevented allodynia and trigeminal sensitization, but this preventive effect was abolished by D-serine administration. Our results suggest that astrocytes contribute to the trigeminal central sensitization and cephalic cutaneous hypersensitivity that characterize the migraine progression. They show that alteration of astrocyte activity could be a new key element in the pathophysiological mechanisms of migraine.

Liste des abréviations

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic

AOC : Area over the curve

AQ : Aquaporine

BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BHE : Barrière hémato encéphalique

CCL2 : C-C Motif Chemokine Ligand 2

CD11b : Cluster of differentiation Molecule 11

CGRP : Calcitonin-Gené Related Peptide

COX2 : Cyclooxygénase 2

CRL : Calcitonin-receptor like

CST : Complexe sensitif du trijumeau

Cx43 : Connexine 43

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand

DAAO : D-amino acide oxydase

DCE : Dépression corticale envahissante

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GLAST : Transporteur du Glutamate et de l'Aspartate

GLUT1 : Transporteur du Glucose 1

GMPC : Guanidine MonoPhosphate cyclique

GS : Glutamine Synthétase

HMGB1 : High Mobility Group Box 1

Il-1 β : Interleukine 1 β

iNOS : nitric oxide synthase inductible

IP3 : Inositol Phosphate 3

ISDN : Isosorbide Dinitrate

JNK : c-Jun N-terminal kinases

LASCA : Laser speckle contrast analysis

LC : Locus coeruleus

LCRa : Liquide céphalorachidien artificiel

L α AA : L- α -aminoadipate

MC : Migraine chronique

MCT : Transporteurs aux monocarboxylates

ME : Migraine épisodique

MHF : Migraine hémiplégique familiale

MOH : Medication Overuse Headache

NF- κ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NO : Monoxyde d'azote

NS : Neurone nociceptif spécifique

NTG : Nitroglycérine

PA : Potentiel d'action

PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide

PAG : Substance grise périaqueducule

PBL : Noyau parabrachial latéral

PeF : Aire perifornicale de l'hypothalamus

Phy : Sérum physiologique

Po : Noyau thalamique postérieur

PSTH : Post-stimulus histogrammes

PVN : Noyau hypothalamique paraventriculaire

RAMP1: Receptor activity-modifying protein 1

ROI : Region Of Interest

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RVM : Aire bulbaire ventro-médiane

SGc : Cellule gliales satellites

sGC : Guanylate Cyclase Soluble

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

SP: Substance P

Sp5 : Noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau

Sp5C : Sous-noyau caudal du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau

Sp5I : Sous-noyau interpolaire du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau

Sp5O : Sous-noyau oral du noyau spinal du complexe sensitif du trijumeau

SPG : Ganglion sphéno-palatine

SRD : Noyau spino-réticulaire dorsal

SuS : Noyau salivaire supérieur

TNS : Tractus du noyau solitaire

VIP : Peptide intestinal vasoactif

VOSAC : volume-stimulated osmolyte and anion channels

VPM : Noyau thalamique ventro-postero-médian

WDR : Wide Dynamic Range neurons, soit les neurones nociceptifs non spécifiques

Liste des figures

FIGURE 1 : LOCALISATION DES DIFFERENTES MUTATIONS IMPLIQUEES DANS LA MIGRAINE HEMIPLEGIQUE

FIGURE 2 : LES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES SENSITIVES. D'APRES SMITH AND LEWIN, 2009

FIGURE 4 : SOMATOTOPIE ET ORGANISATION LAMINAIRE DU SP5C.

FIGURE 3 : ORGANISATION DU COMPLEXE SENSITIF DU TRIJUMEAU ; ADAPTE ET MODIFIE D'APRES DALLEL ET AL., 2003.

FIGURE 5 VOIES ASCENDANTES DES INFORMATIONS NOCICEPTIVES TRIGEMINALES.

FIGURE 6 : LES CONTROLES DESCENDANTS DE LA NOCICEPTION TRIGEMINALE. D

FIGURE 7 : LA DEPRESSION CORTICALE ENVAHISSANTE

FIGURE 8 : DESSIN DES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES MICROGLIALES ILLUSTRÉES PAR RIO HORTEGA EN 1932.

FIGURE 9 : DYNAMIQUE DE LA REPONSE DE LA MICROGLIE EN REPONSE A UNE LESION

FIGURE 10 : MECANISMES DE COMMUNICATION ENTRE LA MICROGLIE ET LES NEURONES

FIGURE 11 : MODELE DE COMMUNICATION MIXTE « DIRECTE ET PARACRINE » DANS LE SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE.

FIGURE 12 : LES DOMAINES DES ASTROCYTES

FIGURE 13 : COMPARAISON DE LA TAILLE ET COMPLEXITE DES ASTROCYTES D'UN RONGEUR ET D'UN HUMAIN :

FIGURE 14 : ORGANISATION DU RESEAU ASTROCYTAIRE

FIGURE 15 : INDUCTION ET PROPAGATION DES VAGUES CALCIQUES ASTROCYTAIRE

FIGURE 16 REGULATION DE LA CONCENTRATION EN $[K^+]_E$ PAR LES ASTROCYTES.

FIGURE 17 : LA SYNAPSE TRIPARTITE.

FIGURE 18 : MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE PAR LA GLIOTRANSMISSION

FIGURE 19 : EXEMPLES DE PROTEINES MEMBRANAIRES PRESENTES AU NIVEAU DES ASTROCYTES ET LEURS FONCTIONS

FIGURE 20 : MORPHOLOGIE D'ASTROCYTES CORTICAUX MARQUES AVEC LA GFAP EN CONDITION NORMALE (GAUCHE) ET EN CONDITION REACTIVE (DROITE)

FIGURE 21 : LES DIFFERENTES VOIES MOLECULAIRES POUVANT ETRE ACTIVEES DANS L'ASTROCYTE. D

FIGURE 22: MECANISMES IMPLIQUES DANS LA DOULEUR NEUROPATHIQUE.

FIGURE 23 : DESIGN DE L'ETUDE

FIGURE 24 : METHODE UTILISEE POUR QUANTIFIER LA SURFACE MARQUEE PAR GFAP

FIGURE 25 : MODIFICATION DE LA SENSIBILITE MECANIQUE CUTANEE FACIALE APRES INJECTION I.P. AIGUE D'ISDN 10 MG/KG (ISDN-1).

FIGURE 26 : MODIFICATION DE LA SENSIBILITE MECANIQUE CUTANEE FACIALE APRES INJECTION REPETEE I.P. D'ISDN 10 MG/KG (ISDN-5).

FIGURE 27 : EFFET DE LA REPETITION DES INJECTIONS I.P (1 INJECTION / JOUR /5 JOURS) D'ISDN (10MG/KG) SUR L'EXPRESSION DE P-ERK1/2 AU NIVEAU DU GANGLION TRIGEMINAL.

FIGURE 28 : EFFET DE LA REPETITION DES INJECTIONS I.P (1 INJECTION / JOUR /5 JOURS) D'ISDN (10MG/KG) SUR L'EXPRESSION DE P-ERK1/2 AU NIVEAU DU SP5C.

FIGURE 29 : CARACTERISTIQUES GENERALES DES NEURONES NOCICEPTIFS ENREGISTRES.

FIGURE 30 : EFFETS DU TRAITEMENT ISDN SUR L'ACTIVITE SPONTANEE DES NEURONES WDR DU SP5C.

FIGURE 31 : REPOSE AUX STIMULATIONS MECANIQUES DES NEURONES WDR.

FIGURE 32 : PROPORTION DE NEURONES SENSIBILISES EN FONCTION DU TRAITEMENT ET DU TYPE DE CELLULE.A CHAMP CUTANE OU MIXTE.

FIGURE 33 : EFFETS DU TRAITEMENT ISDN-1 EN FONCTION DU TYPE DE CHAMP RECEPTEUR (CUTANE OU MIXTE)

FIGURE 34 : EFFETS DU TRAITEMENT ISDN-5 EN FONCTION DU TYPE DE CHAMP RECEPTEUR (CUTANE OU MIXTE)

FIGURE 35 : EFFETS DE L'INJECTION D'ISDN EN CONDITION AIGUË (1 INJECTION ISDN1) OU REPETEE (5 INJECTIONS, ISDN 5) SUR LE POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA REPOSE C

FIGURE 36 : EFFET DE L'INJECTION D'ISDN SUR LA PERFUSION DES MENINGES.

FIGURE 37: IMMUNOMARQUAGE DE GFAP ET SOX9 DANS LE SP5C MESURE APRES INJECTIONS REPETEEES DE SERUM PHYSIOLOGIQUE (PHY 5) OU D'ISDN (ISDN 5).

FIGURE 38 : EFFETS DE LA GLIOTOXINE LAAA SUR L'ALLODYNIE MECANIQUE CUTANEE FACIALE ET L'AUGMENTATION DE LA REPOSE C DES NEURONES WDR DU SP5C INDUITES PAR LA 5^{EME} INJECTION IV D'ISDN (ISDN 5).

FIGURE 39 : EFFETS DU BLOCAGE DE LA DEGRADATION DE LA D-SERINE PAR LA DAAO SUR L'ALLODYNIE MECANIQUE CUTANEE FACIALE INDUITE PAR LA REPETITION DES INJECTIONS D'ISDN

FIGURE 40 : RETABLISSEMENT DE L'ALLODYNIE PAR INJECTION ICT DE D-SERINE.

FIGURE 41 : EFFETS DE L'INJECTION ICT PREVENTIVE DE DAAO SUR L'AUGMENTATION DE LA REPOSE C INDUITE PAR ISDN-5 EN FONCTION DU TYPE DE CHAMP RECEPTEUR.

TABLEAU 1: CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA MIGRAINE SANS OU AVEC AURA, D'APRES ICHD-3

TABLEAU 2 : VUE D'ENSEMBLE DES CARACTERISTIQUES ASSOCIEES A LA MIGRAINE EPISODIQUE ET CHRONIQUE

TABLEAU 3 : REFERENCE ET DILUTION DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES

TABLEAU 4 : REFERENCE ET DILUTION DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES

TABLEAU 5 : RECAPITULATIF DES SEUILS (EN MA) DE DECLENCHEMENT DES DIFFERENTES TYPES DE FIBRES

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury, le Dr Annabelle REAUX - LE GOAZIGO, le Dr Patrice DARBON, le Dr Nasser HADDJERI et le Pr Christine COURTEIX qui ont acceptés d'évaluer mon travail de thèse, ainsi que le Pr Philippe LUCARRINI et le Dr Lénaïc MONCONDUIT pour avoir encadré ce travail.

A mon cher directeur de thèse, Philippe...on peut dire qu'on a parcouru du chemin depuis la première année d'IUT ! Tu as été tout d'abord un professeur passionnant qui m'a permis de découvrir les neurosciences et de mettre pour la première fois les pieds dans un laboratoire de recherche (et dans un poste d'électrophysie *in vivo*, déjà !) au cours de ma deuxième année de DUT. Depuis, l'idée de travailler dans la team Neuro-Dol s'est installée et je ne l'ai plus lâchée, et tu m'as prise sous ton aile en M1, puis M2, puis finalement en thèse. Tu as été un guide, un confident, un soutien, qui m'a toujours écouté et valorisé, grâce à cela j'ai grandi et j'ai pu devenir l'aspirante docteure que je suis aujourd'hui. Je te remercie mille fois pour ces cinq dernières années à travailler ensemble, pour tout ce qu'on a partagé, pour m'avoir également poussé à donner le meilleur de moi-même. Je pense que je n'aurai pas pu être mieux épaulée durant ces 3 dernières années que par toi, et tu garderas à mes yeux toujours une place particulière. Merci encore pour tout, tu es bien sûr invité d'office si tu souhaites venir visiter la Californie.

Lénaïc, je pense qu'un des plus grands regrets de ma thèse sera de ne pas avoir pu travailler ensemble autant que nous l'aurions souhaité. J'ai toujours aimé échanger avec toi, en science ou pour tout autre chose, je me retrouve beaucoup dans ton caractère et ta manière d'être. J'aimerais beaucoup à l'avenir avoir l'occasion de travailler ensemble. Ton parcours et la personne que tu es sont très inspirants pour moi. Je sais que tu arriveras à relever avec brio les challenges qui t'attendent, en tout cas je te remercie encore une fois et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Radhouane, tout d'abord merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et permis de faire ma thèse dans les meilleures conditions. De savoir que j'avais votre confiance et votre soutien quand j'en avais besoin a été un moteur qui m'a aidé à avancer tout au long de ma thèse. J'ai beaucoup de respect et d'admiration envers vous, merci encore pour la gentillesse dont vous avez fait part à mon égard tout au long de ma thèse.

C'est avec émotion que je remercie toute la team «Electrophy *in vivo*», pour commencer Jean-Louis qui m'a formé à l'art subtil d'« écouter » les neurones et d'aller les pêcher à coup de descendeur et de pinceau. Merci pour ta patience et ta gentillesse, je pense que j'ai eu un professeur hors-pair, et je te souhaite une très bonne retraite bien méritée. Merci à Jérémy, au départ compagnon de fortune dans notre antre pleine de 50Hz et de ses harmoniques...devenu un véritable ami. Je te dois beaucoup dans le domptage des cellules méningées du poste ouest, et nos échanges depuis que tu es parti ont été d'un grand secours pendant la phase critique de fin de rédaction ! J'espère qu'on pourra à nouveau partager une Gulden Draak au bar et discuter sans que tu finisses tes phrases. Un merci tout particulier aussi à Nico, mon chilien préféré, débarqué en France sur le poste d'électrophy un peu perdu au début ! Tu es une personne avec un cœur immense, extrêmement bienveillant et toujours à l'écoute et de bons conseils. Merci d'avoir été là dans les moments un peu plus compliqué. Tu as été un soutien solide pendant ses 3 années, tu es aussi devenu un ami très cher, j'espère qu'un jour nos routes se recroiseront. Enfin je souhaite remercier ma petite Gisela, j'ai beaucoup aimé t'apprendre les « petites astuces » d'électrophy et les moments qu'on a passé ensemble au laboratoire et en dehors sont de très bons souvenirs que je garde précieusement. Tu vas assurer dans ton rôle d'ingénieur, je laisse le poste entre de très bonnes mains.

François, je suis très reconnaissante que nos routes se soient croisées quand Lénaïc a décidé de t'embaucher ! Pourtant au début, UN espèce d'ingénieur en analyse de signaux, quarantenaire et un peu geek, sur le papier on n'avait pas grand-chose en commun, et pourtant. Compagnons de café/mot fléché/blague nulle/jeux de rôle/electrophy on s'est bien trouvé, et te rencontrer et te côtoyer a été très enrichissant pour moi. Tu as toujours été disponible, à l'écoute, aussi bien pour parler de choses sérieuses et (surtout !) pour rire, décompresser, et boire une bière. Tu participe grandement à mon bien être au laboratoire, Elodie et toi allais beaucoup me manquer.

Il y a aussi 3 personnes au grand cœur que je souhaite remercier, les mamans piou-piou, Anne-Marie, Amélie et Karine. Anne-Marie tu m'as écrit pour les catherinettes une très belle citation : « Certaines personnes ne font que passer dans nos vies tandis que d'autres laissent une trace indélébile », et je dois dire que cela résume bien les choses. Si je me sentais si bien au laboratoire, c'était aussi grâce à vos sourires, d'échanger quelques mots tous les

matins, et de sentir votre bienveillance à mon égard. Vous êtes de vraies belles personnes, merci pour tout.

Merci aussi à Céline, Christelle, Myriam, Cristina et Cédric pour nos échanges au cours des 3 dernières années, surtout pendant la pause de midi dans la joie et la bonne humeur à chaque fois ! Céline, tu m'as aidé dans le choix de partir pour voir autre chose, et je te remercie d'avoir toujours été à l'écoute et de bons conseils. Je te souhaite tout le bonheur du monde tu le mérite ma belle. Cédric, merci pour ta disponibilité dès que j'avais une question, et pour ton aide pour décrocher mon post-doc et pour préparer le voyage outre-atlantique. Bonne continuation à toi et à ta petite famille.

Je remercie tous les doctorants du laboratoire, Sarah, Elric, Jennyfer, Maxime et Rémi. Elric, ton parcours a été tumultueux ! J'espère que tu arriveras à la ligne d'arrivée de la thèse mais surtout que tu trouveras ta voie et le bonheur ensuite. Sarah, on a toutes les 2 passé tout un tas d'épreuves ensemble, et je te suis très reconnaissante pour tout ce qu'on a partagé depuis la L3 jusqu'à maintenant, je ne me fais aucun soucis pour toi tu vas finir ta thèse en beauté l'année prochaine. Je te souhaite de trouver un super post-doc ensuite, et avant tout d'être heureuse et épanouie. Je te laisse en compagnie des 2 petits piou piou Maxime et Jennyfer. Max et Jenny j'ai été très contente de faire votre connaissance, même si vous m'avez surtout connu devant mon ordi à rédiger ! Je vous souhaite bon courage pour finir votre thèse et de trouver votre voie ensuite. Rémi, nous avons beaucoup de valeurs importantes en commun, tu es une super rencontre, ne change rien. Tu es une personne très « solaire » (on s'est mis d'accord avec Julie sur cet adjectif !) et je suis plus qu'heureuse de te compter parmi mes amis.

Finalement, je remercie l'équipe Neuro-Dol au grand complet, les membres de notre équipe que je n'ai pas citée et les membres des autres équipes. J'ai été heureuse de faire partie de cette grande famille pendant 3 ans.

Enfin, le mot de la fin revient à ma famille et à mes amis les plus proches, qui m'ont accompagné de la meilleure des manières au long de ce périple qu'est la thèse. On dit rarement aux gens qui nous entourent qu'on les aime, je profite donc de cette occasion pour leur rappeler à quel point ils sont importants pour moi. Se sentir aimée donne des ailes, et sans cela je n'aurais pas pu aller aussi loin.

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction

La migraine	1
I. Généralités	1
A. Prévalence.....	1
B. Tableau clinique	1
C. Critères de diagnostic	2
D. Facteurs déclencheurs de la crise de migraine.....	2
E. Facteurs de risques	3
II. La nociception trigéminalle	6
A. Anatomie.....	6
B. Intégration des informations nociceptives	9
C. Contrôles supra spinaux de la transmission du Sp5C	11
III. Physiopathologie de la migraine	15
A. La théorie vasculaire	15
B. La théorie de l'inflammation neurogène	16
C. La dépression corticale envahissante	18
D. La contribution du système parasympathique	19
IV. Traitements	20
A. Traitements de crise	20
B. Traitements de fond	21
V. La migraine chronique	24
A. Généralités	24
B. Les facteurs de risque	25
Les cellules gliales	27
I. Historique de la glie.....	27
II. Les différents types de cellule gliales	28
A. La microglie	28
B. Les oligodendrocytes	30
C. Les cellules gliales périphériques.....	30

III.	Les astrocytes	31
A.	Historique.....	32
B.	Caractéristiques des astrocytes	32
C.	Fonctions physiologiques des astrocytes	37
IV.	Interactions neurones/astrocytes	39
A.	Recouvrements anatomiques de la synapse	39
B.	Recapture des neurotransmetteurs	39
C.	Libération des gliotransmetteurs.....	40
V.	Physiopathologie	43
A.	La réactivité astrocytaire	43
B.	Les astrocytes et la douleur	44

Les astrocytes et la migraine 47

I.	Que sait-on du lien entre astrocyte et migraine ?	47
II.	Problématique	49

Chapitre 2 : Matériel et méthode

I.	Animaux.....	51
II.	Substances administrées	51
III.	Analyse Comportementale.....	53
A.	Phase d'habituation	53
B.	Phase de test de la sensibilité mécanique de la face	54
C.	Test de psychomotricité (Rotarod)	54
IV.	Immunohistochimie.....	54
A.	Stimulation et perfusion	54
B.	Coupe des tissus.....	55
C.	Marquage.....	55
D.	Acquisitions et quantifications des marquages de l'étude immunohistochimique	56
V.	Enregistrements électrophysiologiques unitaires extracellulaires <i>in vivo</i>	58
A.	Préparation chirurgicale	58
B.	Enregistrements des neurones à convergence.....	59
VI.	Mesure de la vascularisation des méninges.....	64
VII.	Analyse statistique.....	65

Chapitre 3 : Résultats

L'ISDN entraîne une sensibilisation trigéminal 67

- I. Approche Comportementale (test de von Frey) 67
 - A. ISDN 1 injection..... 67
 - B. ISDN 5 injections 68
- II. Approche Immunohistochimique..... 69
 - A. Expression de p-ERK dans le ganglion de Gasser..... 69
 - A. Expression de p-ERK dans le Sp5C 70
- III. Approche Electrophysiologique 71
 - A. Localisation des neurones enregistrés..... 71
 - B. Nature des neurones enregistrés 71
 - C. Modification par l'ISDN des propriétés et réponses des neurones WDR... 72
- IV. Contrôles inhibiteurs diffus induits par nociception 78
- V. L'ISDN entraîne une vasodilatation méningée de courte durée 79

Les astrocytes et la sensibilisation trigéminal..... 80

- I. Les astrocytes présentent un phénotype réactif en condition ISDN chronique 80
- II. Le blocage de l'activité des astrocytes prévient la sensibilisation trigéminal82
 - A. Inhibition de l'allodynie cutanée chez le rat vigile. 82
 - B. Inhibition de la sensibilisation des neurones WDR 82
- III. La sensibilisation trigéminal est D-sérine dépendante 83
 - A. L'allodynie mécanique dépend de la D-sérine..... 83
 - B. La DAAO prévient la sensibilisation des neurones WDR 84

Chapitre 3 : Discussion et perspectives

Discussion 87

- I. Une sensibilisation centrale dès le stade aigu. 88
- II. Une sensibilisation centrale qui s'amplifie avec le stade chronique. 88
- III. Différences mâle et femelle dans le modèle ISDN 89
- IV. La sensibilisation des neurones WDR du Sp5C par la répétition des injections d'ISDN 91
 - A. Les injections répétées ne modifient pas les caractéristiques basales des neurones WDR 91

B.	Différences entre neurones à champ cutané et neurones à champ mixte ..	92
C.	Sensibilisation des neurones WDR aux stimulations mécaniques.....	93
D.	Composante périphérique de la sensibilisation trigéminal	94
V.	Sensibilisation centrale trigéminal et altération des contrôles descendants inhibiteurs	94
VI.	Les astrocytes du Sp5C participent à la sensibilisation trigéminal	96
VII.	Gliotransmission D-sérinérgique et sensibilisation trigéminal ISDN-induite	97
VIII.	Mécanismes de mise en jeu des astrocytes	98
	Conclusion	100
	Perspectives	101

Chapitre 4 : Références bibliographiques

Annexe : Extraction and modeling of C-fiber-evoked local field potential in deep dorsal horn from heavily corrupted signal

Chapitre 1 : Introduction générale

La migraine

I. Généralités

A. Prévalence

La migraine est une des atteintes neurologiques les plus fréquentes touchant près de 13% de la population générale, et plus particulièrement les femmes (17% de femmes contre 8% d'homme en Europe) (Lipton et al., 2007). Son impact sur la qualité de vie et le coût sociétal qu'elle engendre sont très importants avec près de 18.5 milliards d'euros par an en Europe (Olesen et al., 2012). L'étude « Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors » a évalué et classé la migraine parmi les pathologies causant le plus d'invalidité au monde. La dernière étude en date, la GBD de 2016 la classe même en 2^{ème} position (Steiner et al., 2018). Elle constitue ainsi un enjeu de santé publique majeur.

B. Tableau clinique

Les crises de migraine sont définies et caractérisées par des céphalées, d'intensité modérée à sévère, unilatérale, pulsatile, pouvant durer près de 72h en l'absence de traitement. Elles sont en plus accompagnées de signes végétatifs (nausée et/ou vomissement) et d'hypersensibilité aux stimulations sensorielles comme une phonophobie, une photophobie ou encore une osmophobie. On retrouve chez certains patients une sensibilité cutanée anormale pendant et également entre les crises de migraine. Cette hypersensibilité, appelée allodynie, entraîne la perception d'un stimulus non douloureux (comme le contact du visage sur l'oreiller) comme étant douloureux. L'apparition de ce symptôme est considérée comme un facteur de risque de progression de la migraine vers le stade chronique, que nous définirons plus précisément dans le paragraphe suivant (Louter et al., 2013).

Il est également intéressant de noter qu'en amont des crises de migraines, il existe un ensemble de symptômes précédant de plusieurs heures les crises de migraine, appelés prodromes. Ces symptômes peuvent être variés : fatigue, euphorie, dépression, irritabilité, constipation, raideur de la nuque, sensibilité anormale aux sons et lumières (tout comme pendant la crise de migraine) (Schoonman *et al.*, 2006). Cette phase de prodrome précède l'aura, rencontrée chez environ 20% des patients, qui apparaît quelques minutes avant et/ou pendant la crise de migraine.

1.1 Migraine sans aura
A : Au moins cinq crises répondant aux critères B à D
B : Crises de céphalées durant 4 à 72 heures (sans traitement)
C : Céphalées ayant au moins deux des caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • topographie unilatérale • type pulsatile • intensité modérée ou sévère • aggravée par ou entraînant l'évitement des efforts physiques de routine (marcher, monter les escaliers)
D : Durant la céphalée, au moins l'un des suivants : <ul style="list-style-type: none"> • nausées et/ou vomissements • photophobie et phonophobie
E : N'est pas mieux expliquée par un autre diagnostic de l'ICHD-3
1.2 Migraine avec aura typique
A : Au moins deux crises répondant aux critères B et C
B : Aura comprenant des troubles visuels, sensitifs et/ou de la parole ou du langage, tous entièrement réversibles, mais pas de symptôme moteur, basilaire ou rétinien
C : Au moins deux des quatre caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • au moins un symptôme de l'aura se développe progressivement en \geq 5 minutes et/ou les différents symptômes de l'aura surviennent successivement • chaque symptôme de l'aura dure 5–60 minutes • au moins un symptôme de l'aura est unilatéral • l'aura est accompagnée, ou suivie dans les 60 minutes, par une céphalée
D : N'est pas mieux expliquée par un autre diagnostic de l'ICHD-3 et un accident ischémique transitoire a été exclu

Tableau 1: Critères diagnostiques de la migraine sans ou avec aura, d'après ICHD-3

L'aura migraineuse qui est une manifestation de symptômes neurologiques est la plupart du temps visuelle, avec l'apparition de taches lumineuses ou au contraire sombres dans le champ visuel. Des déficits sensitifs et/ou moteurs (langage) peuvent également être associés (ICHD, 3ème édition, 2018).

C. Critères de diagnostic

Les critères de diagnostic de la migraine ont été établis par l'International Headache Society (IHS) pour la première fois en 1988 dans l'*International Classification of Headache Disorders*, et ont été réactualisés en 2004 puis en 2018, sous la forme de l'ICHD-3. Ils sont représentés dans le Tableau 1. Ces critères permettent de différencier la migraine d'autres types de céphalées, comme les céphalées de tension ou les névralgies primaires. Au sein des patients migraineux, on va également différencier ceux présentant des auras dites « typiques » des autres patients. La fréquence de ces crises va également définir les patients en 2 catégories : les patients migraineux épisodiques et les patients migraineux chroniques. Les migraines classées chroniques sont définies comme des céphalées survenant au moins 15 jours par mois pendant plus de 3 mois et se caractérisant par des migraines pendant au moins 8 jours par mois.

D. Facteurs déclencheurs de la crise de migraine

La majorité des patients migraineux (72,5%, Baldacci et al., 2013) mentionnent un certain nombre de facteurs liés au déclenchement de leurs crises. Ces facteurs sont très variés, les principaux reportés sont :

- Les émotions fortes, le stress, l'anxiété
- Des changements dans les habitudes de vie, notamment le manque de sommeil ou au contraire le fait de dormir plus qu'à la normale.
- La déshydratation et le jeûn
- La prise de certains aliments : l'alcool (notamment ceux contenant des sulfites)
- Des stimulations sensorielles, comme une forte lumière, certaines odeurs, le bruit
- Les facteurs hormonaux, sur lequel nous reviendrons en tant que facteur de risque.

E. Facteurs de risques

Sous certaines conditions, la prévalence de la migraine est supérieure à celle observée dans la population générale. Les causes qui sous-tendent le lien entre la migraine et ces facteurs n'est pas toujours établis, mais ils peuvent amener des éléments de compréhension supplémentaires de la physiopathologie. .

➤ *Facteurs hormonaux*

Etant donné la large prévalence de la migraine chez la femme par rapport à l'homme (3/1), il devient évident qu'il existe un lien très fort entre variations hormonales sexuelles et risque migraineux. Il est intéressant de noter d'ailleurs qu'il y a autant de garçons que de filles touchés par la migraine avant la puberté, et que c'est seulement après la puberté que la différence entre homme/femme se dessine (Stewart *et al.*, 1991). Chez les femmes souffrant de migraine, les crises arrivent plus fréquemment autour du premier jour des règles (+ ou - 2 jours) ce qui correspond à la chute du taux d'œstrogènes (Stewart *et al.*, 2000). Lorsque les crises de migraines sont associées au cycle menstruel, le terme de « migraine cataméniale » est utilisé. Après la puberté, 50% des femmes imputent leur crise de migraine à leur cycle menstruel (Couturier *et al.*, 2003) mais nous retrouvons peu de femmes (3 à 12,5%) souffrant de migraines cataménales « pures » (Brandes, 2006). La fréquence des crises va diminuer à la ménopause (Faubion *et al.*, 2018) ou encore pendant la grossesse (Faubion *et al.*, 2018; Goadsby *et al.*, 2008). Ces éléments montrent l'importance des hormones, et plus particulièrement des œstrogènes, dans la migraine (Chai *et al.*, 2014a).

➤ *Facteurs génétiques*

Il a été démontré clairement que la migraine avait une composante génétique importante, les études familiales ou chez les jumeaux ont permis d'estimer son caractère héréditaire à 42% (Polderman *et al.*, 2015), sans pour autant qu'un marqueur universel ne soit identifié (Russell, 1997). Cependant dans le cas de la migraine hémiplégique familiale (MHF*), une forme rare de migraine, caractérisée par des auras motrices qui provoquent une faiblesse musculaire pouvant aller jusqu'à la paralysie complète (Pietrobon, 2007), 3 mutations autosomiques dominantes ont été identifiées :

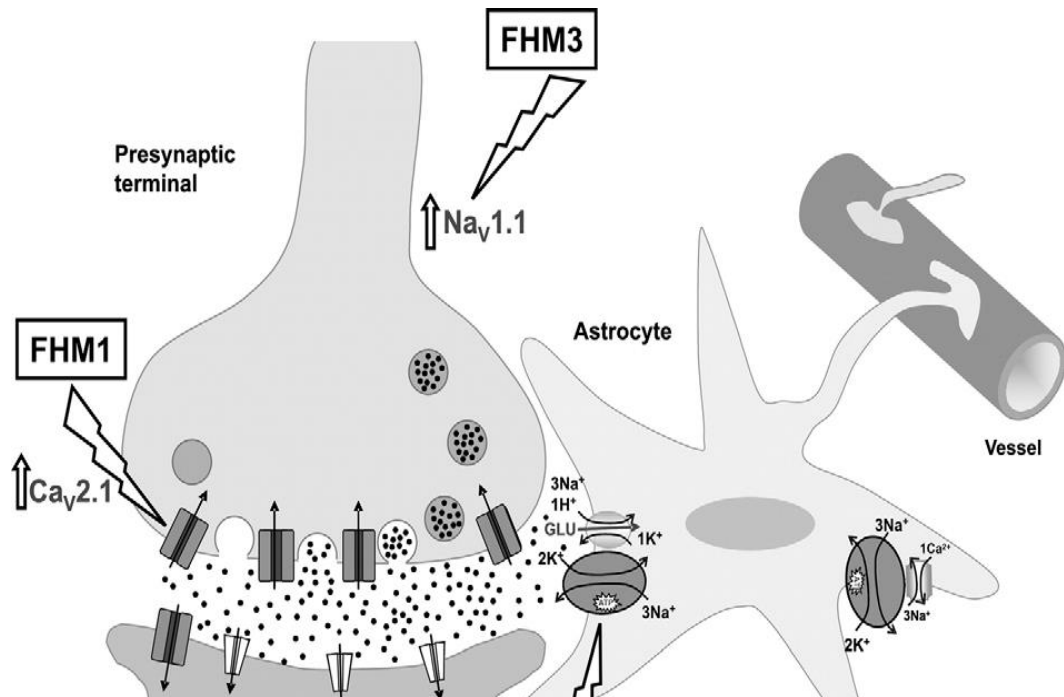


Figure 1: Localisation des différentes mutations impliquées dans la migraine hémiplégique familiale. Toutes ces mutations vont tendre à augmenter l'excitabilité neuronale via un dérèglement de l'homéostasie ionique. D'après Pietrobon et al. , 2007.

- La première est une mutation du gène CACNA1A, qui code pour la sous-unité alpha 1 du canal Cav 2.1 et entraîne un gain de fonction de ce canal. Ce canal, largement exprimé dans l'ensemble du système nerveux central, est très important dans les mécanismes de libération présynaptique des neurotransmetteurs et dans l'excitabilité neuronale postsynaptique (Pietrobon and Brennan, 2019).
- La deuxième mutation est celle du gène ATP1A2, qui code pour la sous-unité alpha 2 d'une pompe Na⁺/K⁺ astrocytaire, qui entraîne une perte de fonction de celle-ci. Plus particulièrement, au niveau cortical cette pompe co-localise avec les transporteurs de glutamate GLAST et GLT-1 au niveau des prolongements astrocytaires, indiquant son implication dans la régulation des synapses excitatrices glutamatergiques (Cholet et al., 2002). La pompe Na⁺/K⁺ astrocytaire est très peu présente autour des synapses inhibitrices, indiquant que la perte de fonction liée à la mutation du gène ATP1A2 va plutôt favoriser la transmission glutamatergique excitatrice, via une diminution de la clairance du glutamate et des ions K⁺ (Capuani et al., 2016; Cholet et al., 2002; Pietrobon and Brennan, 2019).
- Enfin la mutation du gène SCN1A, codant la sous-unité alpha 1 du canal Nav 1.1 entraîne un gain de fonction du canal. Il est exprimé majoritairement par les interneurons inhibiteurs, au niveau du segment initial de leur axone. Il joue un rôle clef dans l'excitabilité de ces neurones, et une perte de fonction de ce canal est d'ailleurs corrélée à l'épilepsie (Schutte et al., 2016). Or dans le cas de la migraine hémiplégique familiale, c'est une mutation de type gain de fonction, indiquant que cette forme de migraine est associée à une hyperexcitabilité des interneurons inhibiteurs. Les résultats entre épilepsie et migraine semblent en opposition et restent difficiles à interpréter, d'autant que l'épilepsie est une comorbidité courante chez les patients migraineux montrant qu'il y a un lien entre les mécanismes sous-tendant ces 2 pathologies.

Les 3 mutations identifiées dans la cadre de la MHF concernent toutes des gènes impliqués dans la régulation ionique (canaux ou transporteur), suggérant que la migraine, dans certaines conditions, serait plutôt une canalopathie.

Outre les mutations impliquées dans ce type de migraine, des études sur de grandes bases de données génomiques ont tenté d'identifier des marqueurs génétiques de la migraine

qui pourraient apporter des éléments de réponse pour mieux comprendre sa physiopathologie. Notamment, une étude de « genome-wide association » (GWA*) a été publiée en 2016 dans *Nature Genetics*. (Gormley et al., 2016). Ce travail a mis en lumière 38 loci associés à un risque plus élevé de migraine. Cependant, la conclusion de l'étude était que la migraine, en dehors des MHF, n'est pas une canalopathie, puisque les mutations concernant des canaux ne représentaient que 2 loci parmi les 38 identifiés. En revanche, l'analyse détaillée des loci identifiés a mis en évidence une présence de ces polymorphismes dans les tissus vasculaires, ce qui conforte le rôle important joué par la composante vasculaire dans la migraine (Gormley et al., 2016). En s'appuyant sur ces résultats, une étude plus poussée sur des données de séquençage ARN sur cellule unique (single-cell RNA sequencing, Renthal, 2018) a permis de montrer que ces mutations touchaient tous les types cellulaires présents dans le cerveau (neurones, astrocytes, microglie, oligodendrocytes, cellules endothéliales), et que 40% du polymorphisme des gènes associés à la migraine était spécifique d'un sous-type de cellule. Ainsi, il convient de considérer que tous les types de cellules (neuronales, gliales ou endothéliales) peuvent jouer un rôle significatif dans la physiopathologie de la migraine (Renthal, 2018).

➤ *L'obésité*

Ce facteur de risque a été plus récemment mis en cause dans la migraine (Pavlovic et al., 2017). En effet, la prévalence de la migraine est plus élevée dans la population de patients présentant un IMC > 30 (Scher et al., 2003). L'obésité peut augmenter la fréquence et la gravité des crises de maux de tête (céphalée de tension) et semble augmenter le risque de développer une migraine (Chai et al., 2014b). Des résultats expérimentaux indiquent de multiples zones de chevauchement entre la physiopathologie de la migraine et les mécanismes liés à un excès de graisse corporelle (Chai et al., 2014c). L'obésité qui a été caractérisée comme étant un état inflammatoire à bas bruit permanent peut être relié à la migraine où la composante inflammatoire est importante (cf paragraphe inflammation neurogène). Enfin, il a été montré que le taux de CGRP, neuropeptide jouant un rôle central dans la migraine, était supérieur chez le sujet obèse et que la prise de lipides entraînait l'augmentation de la libération de CGRP (Recober and Goadsby, 2010).

➤ *Anxiété et dépression*

Les réponses inadaptées (pathologiques) au stress que sont l'anxiété et la dépression sont les principales comorbidités associées à la migraine (Baskin et al., 2006). Elles constituent un facteur important de la progression vers le stade chronique de la maladie (cf paragraphe dédié à la migraine chronique).

La dépression est l'une des comorbidités psychiatriques les plus courantes chez les patients migraineux. Trois études différentes ont montré que les migraineux avaient 2,5 fois plus de risques de souffrir de dépression que les non-migraineux (Lipton et al., 2000; Minen et al., 2016; Zwart et al., 2003). La relation entre migraine et dépression semble être bidirectionnelle (Breslau et al., 2000). Les troubles anxieux (anxiété généralisée, panique, troubles compulsifs et phobies) sont quant à eux 2 à 5 fois plus fréquents chez les patients migraineux que dans la population générale (Buse et al., 2013; Minen et al., 2016). Ces symptômes sont également retrouvés dans les modèles de migraine chez l'animal, notamment dans le modèle par injection de soupe inflammatoire sur les méninges chez le rat (Melo-Carrillo and Lopez-Avila, 2013; Zhang et al., 2017).

II. La nociception trigéminal

Touchant la sphère céphalique, la migraine est liée aux messages nerveux véhiculés par les fibres du nerf trijumeau (nerf crânien V) et ses 3 branches mandibulaire, maxillaire et ophtalmique qui assurent l'innervation sensitive des territoires oraux, péri-oraux et méningés. Ces fibres relient les tissus périphériques (peau, muscles, muqueuses, dents, parois vasculaires méningées...) au premier relais central (segmentaire) localisé dans le complexe sensitif du trijumeau (CST*). A partir de ce premier relais, les messages seront véhiculés *via* des voies ascendantes vers des relais supraspinaux tels la formation réticulée, le thalamus afin d'accéder ensuite aux aires corticales pour intégrer les composantes sensori-discriminatives et cognitivo-émotionnelles de la douleur.

A. Anatomie

➤ *Périphérie : nerf et branches trigéminales*

Le nerf crânien V est composé de fibres qui correspondent aux axones des neurones en T dont les corps cellulaires se trouvent dans le ganglion de Gasser (ou autrement appelé Ganglion trigéminal). Chaque neurone sensoriel possède un prolongement axonal au contact

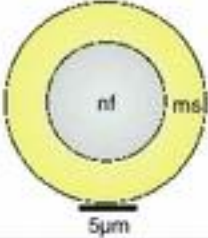










Fiber	Cross section	Fiber type	Sensation	CV (m/s)	Thermo-sensitivity
A β		RAM	Touch	>10	
		SAM	Touch	>10	
A δ		D-hair	Touch	2-10	
		AM	Nociception	2-10	
C		C-polymodal	Nociception	<1.5	
		CM/MH/MC/H	Nociception	<1.5	
		"silent"	Nociception ^e	<1.5	
		CLT	Touch ^e	<1.5	

Figure 2 : Les différents types de fibres sensibles. D'après Smith and Lewin, 2009
 nf : fibre nerveuse, ms : gaine de myéline, CV : vitesse de conduction, RAM: mécanorécepteur à adaptation rapide, SAM : mécanorécepteur à adaptation lente, AM : A δ -mécanonocicepteur, CM: C-mécanonocicepteur, CMH : C-mecano-thermo-nocicepteur au chaud, CMC : C- mecano-thermo-nocicepteur au froid CH: C-nocicepteur thermique; CLT: fibre C a bas seuil d'activation

des tissus périphériques et un autre au contact des neurones de second ordre, situés dans le CST. Au niveau des tissus, nous retrouvons différents types de fibres capables de détecter les stimuli périphériques via les mécanorécepteurs, thermorécepteurs, récepteurs polymodaux, et nocicepteurs. Il existe 3 grand types de fibres (Figure 2, Smith and Lewin, 2009): Les fibres $A\beta$ sont des fibres de gros diamètre, richement myélinisées, elles proviennent majoritairement de la peau et acheminent les stimuli mécaniques non nociceptifs. Les fibres $A\delta$ sont plus petites et moins myélinisées, elles acheminent l'information douloureuse. Les fibres C, encore plus petites et non myélinisées, transmettent, elles-aussi, l'information nociceptive mais également les informations thermiques non douloureuses. Ces deux derniers types de fibres sont donc celles transportant la majorité des informations nociceptives. Les propriétés respectives de ces fibres, notamment à travers la vitesse de conduction de l'information nerveuse, aboutissent à une discrimination temporelle dans la détection du stimulus douloureux. Les fibres $A\delta$ permettent une détection rapide et aigüe du stimulus douloureux à sa perception consciente du stimulus alors que les fibres C, dont la conduction est plus lente, apportent une réponse différée et plus diffuse.

Ces différentes fibres vont donc constituer le nerf V, qui va se diviser en 3 branches en fonction de la zone innervée (Cf Figure 3) :

- La branche ophtalmique, nommée V1, innerve la région péri-orbitale (y compris le globe oculaire et la cornée), la peau au-dessus de l'œil (paupière, sourcil), le nez et la muqueuse nasale, les sinus frontaux, les méninges (principalement autour des vaisseaux sanguins) ainsi que la peau du front et du cuir chevelu.
- La branche maxillaire V2 innerve quant à elle la paupière inférieure, les ailes du nez, la joue, les narines, le maxillaire supérieur, la lèvre supérieure, la bouche avec les dents et les gencives comprises, le sinus ethmoïde et sphénoïde, ainsi qu'une partie des méninges
- La branche mandibulaire V3 innerve le reste de la sphère céphalique à savoir la lèvre inférieure, le menton, le maxillaire inférieur, les dents et les gencives inférieures ainsi qu'une grande partie de la langue.

Les méninges étant le seul tissu intra-crânien innervé, jouent un rôle central dans la migraine. La transmission des messages nociceptifs issus des méninges se fait de manière similaire à ceux d'origine viscérale. La majorité des récepteurs méningés sont des nocicepteurs

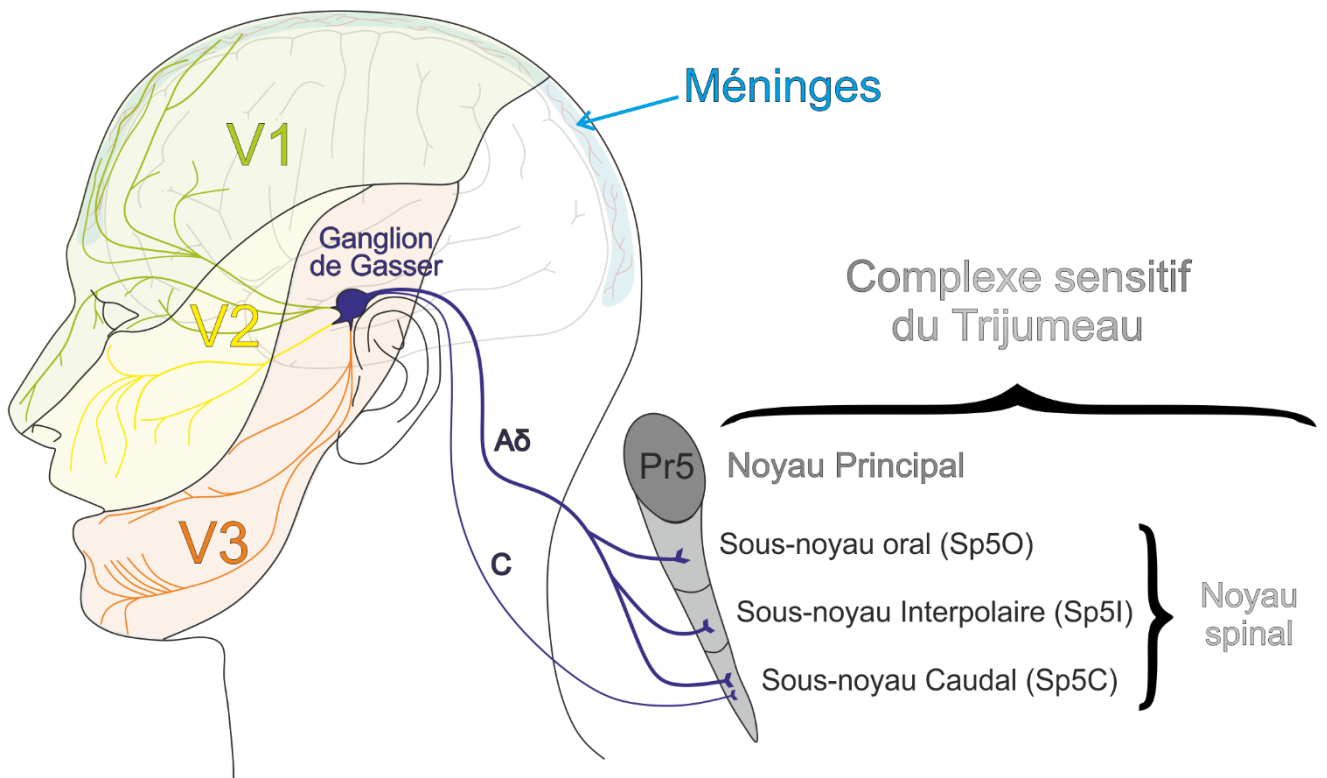


Figure 3 : Organisation du complexe sensitif du trijumeau ; adapté et modifié d'après Dallel et al., 2003.

Le nerf V innerve la sphère céphalique (méninges comprises) via ses 3 branches : V1 (ophtalmique) V2 (maxillaire) et V3 (mandibulaire). Ces 3 branches se rejoignent au niveau du ganglion de Gasser. Les fibres afférentes rejoignent ensuite, au niveau central, le complexe sensitif du trijumeau (CST). Il est divisé en 2 noyaux : le noyau principal et le noyau spinal, lui-même divisé en 3 sous-noyaux (oral, interpolaire et caudal). Notez qu'en fonction du type de fibres, les projections sur le CST vont être différentes : les fibres Adelta vont projeter sur l'ensemble du noyau spinal, alors que les fibres C vont projeter en très grande majorité sur le sous-noyau caudal (Sp5C)

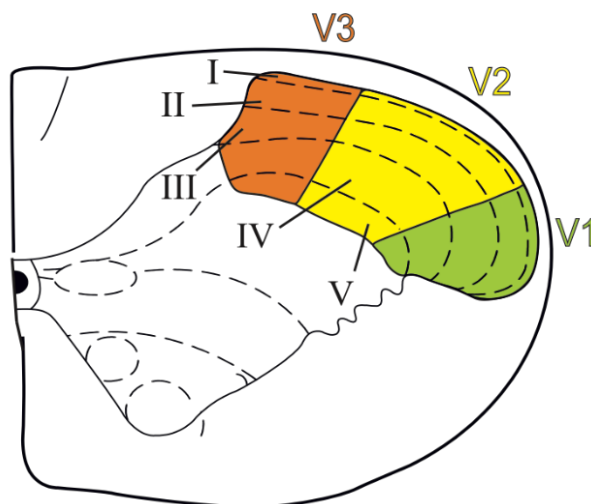


Figure 4 : Somatotopie et organisation laminaire du Sp5C. Les fibres afférentes primaires composant le nerf V vont projeter au niveau du Sp5C avec une organisation somatotopique. On notera aussi que le Sp5C a une organisation laminaire similaire à celle retrouvée dans la corne dorsale spinale (il est en effet dans le prolongement).

polymodaux de fibres peu myélinisées A δ et de fibres non myélinisées C. Ils répondent à des stimuli de natures variées (Strassman *et al.*, 1986, 1996). Ces afférences sont en majorité peptidergiques, exprimant la substance P (SP*) et le Calcitonin-Related Peptide (CGRP*) (Strassman and Levy, 2006). Les afférences méningées proviennent principalement de la branche ophtalmique V1, avec certaines afférences provenant des branches V2 et V3 ainsi que des branches cervicales C1 et C2 (Arbab *et al.*, 1986). On retrouve ces afférences en grand nombre autour des vaisseaux de gros ou de petits calibres, mais également au niveau des zones peu vascularisées. Ces fibres font relais au niveau des couches superficielles du sous-noyau caudal. De plus, les méninges reçoivent des afférences du système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) (Arbab *et al.*, 1986).

Les 3 branches du nerf V se rejoignent au niveau du Ganglion de Gasser. Et de là les fibres projettent vers le CST. Celles provenant de la branche V1 et V2 sont difficilement dissociables, tandis que la branche mandibulaire est nettement séparée des 2 autres, au niveau postéro-latéral.

Il est à noter que les somas des neurones ganglionnaires sont entourés de cellules satellites (SGC*) qui forment une « gaine » composée de 2 à 20 SGCs par neurone (Thalakoti *et al.*, 2007).

➤ *Premier relais central : les noyaux du CST*

Les fibres primaires parviennent, *via* le faisceau trigéminal latéral, jusqu'au niveau du CST qui s'étend le long du tronc cérébral depuis la limite caudale du mésencéphale jusqu'aux premières vertèbres cervicales. Ces projections sont organisées selon le calibre des fibres, celles myélinisées larges (A β) étant en position médiane du faisceau alors que les fibres peu ou pas myélinisées (C et A δ) se trouvent plutôt dans la partie latérale du faisceau (Crissman *et al.*, 1996). Les projections vont ensuite soit se diviser en 2 collatérales et projeter d'une part sur le noyau principal du CST (Pr5*) et d'autre part sur le noyau spinal (Sp5*), soit directement sur le noyau spinal (Waite and Ashwell, 2012). Ce dernier est lui-même divisé en 3 sous-noyaux :

- Le sous-noyau oral (Sp50*), situé dans le prolongement caudal du noyau principal. Il reçoit les afférences orales et péri-orales non-nociceptives et nociceptives.

- Le sous-noyau interpolaire (Sp5I*), situé entre le Sp5O, et le Sp5C, reçoit les afférences intra et péri-orales non nociceptives (notamment des vibrisses), mais qui sont moins denses que pour le Sp5O (Waite and Ashwell, 2012).
 - Le sous-noyau caudal (Sp5C*) s'étend de l'obex jusqu'aux premiers segments de la moelle cervicale C1-C2. C'est le relais majeur des informations thermiques et nociceptives provenant de la face. Le Sp5C a une organisation fonctionnelle comparable à celle de la moelle épinière avec une organisation laminaire (couches I-V) visible sur la **Figure 3**.

Il est à noter que les afférences du nerf V vont projeter selon une organisation somatotopique sur ces différents noyaux : Les afférences de la branche V1 se projetant dans l'aire ventrale du Sp5C, celles de la V2 dans l'aire intermédiaire, et celles de V3 dans l'aire dorsale (**Figure 4**).

Au niveau du CST, sont intégrés les messages des différentes modalités qu'elles soient nociceptives ou non. Ici, nous traiterons plus particulièrement l'intégration des messages nociceptifs.

B. Intégration des informations nociceptives

➤ *Intégration segmentaire au niveau du Sp5C*

Les informations nociceptives périphériques via les fibres C et A δ arrivent presque exclusivement au niveau du Sp5C où elles activent des neurones de projection qui vont ensuite transmettre le message nociceptif aux structures supra-spinales. Ces neurones de projection sont principalement situés au niveau des couches superficielles (I) et profondes (V) du Sp5C, et sont représentés par deux types: les neurones nociceptifs spécifiques et les neurones nociceptifs non-spécifiques. Les neurones nociceptifs spécifiques (NS*) sont situés au niveau des couches superficielles (I-II) et sont uniquement activés par des stimulations nociceptives. Les neurones nociceptifs non-spécifiques (Wide Dynamic Range, WDR* neurons), situés dans les couches profondes (V), sont activés par une large gamme de stimulations nociceptives et non-nociceptives, notamment mécaniques comme le tact léger, le brossage, ou le pincement. Les neurones WDR reçoivent non seulement des messages véhiculés par les fibres C (indirectement, *via* les interneurones situés dans la couche II), mais également *via* les fibres de types A β et A δ ce qui leur permet de répondre à une grande variété de stimuli.

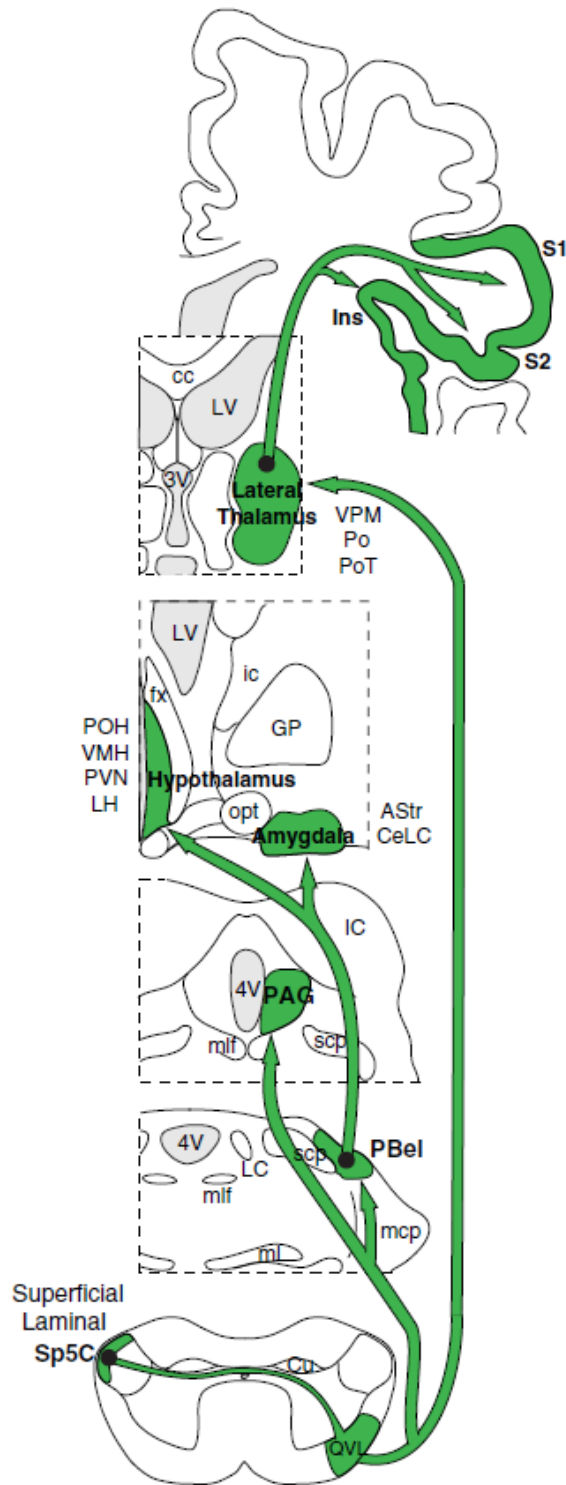


Figure 5 : Voies ascendantes des informations nociceptives trigéminales. D'après Nosedá et Villanueva, 2017

Cg : cortex cingulaire, Ins : cortex insulaire, LH ; noyau hypothalamique médial, PAG : Substance grise périaqueducule, PBel : noyau parabrachial, partie latérale externe, Po : Noyaux thalamiques postérieurs, POH : Noyau hypothalamique préoptique, PoT : noyau hypothalamique triangulaire postérieur, PVN : Noyau hypothalamique paraventriculaire, QVL : Quadrant ventrolatéral, S1 : Cortex somatosensoriel primaire, S2 : cortex somatosensoriel secondaire, VMH : Noyau

Les neurones NS sont plus particulièrement impliqués dans l'intégration de la composante émotionnelle de la douleur alors que les non-spécifiques WDR seraient plus spécialisés dans sa composante sensori-discriminative, en particulier dans la discrimination de l'intensité du stimulus nociceptif. D'autre part, les neurones WDR reçoivent à la fois des afférences provenant des méninges et de la peau (Davis and Dostrovsky, 1988). Cette convergence entre territoire viscéral/cutané explique la douleur référée au niveau cutané au moment des crises de migraine, ce qui fait des neurones WDR un élément central dans la physiopathologie de la migraine.

➤ *Intégration supra-segmentaire*

A partir des neurones de second ordre, le message nociceptif va être transmis aux relais et centres supra-spinaux. Les principales voies de transmission sont résumées sur la Figure 5, d'après une revue de Nosedá and Villanueva, 2017. En fonction du type de neurone activé, le message va transiter *via* différentes voies participant aux différentes composantes de la douleur.

Les neurones de la couche I vont projeter majoritairement (50%) sur le noyau parabrachial latéral (PBL*), ainsi que sur le noyau salivaire supérieur (SuS*) et le tractus du noyau solitaire (TNS*). Ces projections permettent d'expliquer le réflexe cardiorespiratoire induit par une stimulation nociceptive (Andrew *et al.*, 2003). Les projections du PBL vont ensuite atteindre les noyaux de l'amygdale (Jasmin *et al.*, 1997) et également l'hypothalamus (Iversen *et al.*, 1989), ce dernier recevant également des projections directes via la voie trigémino-hypothalamique (Malick *et al.*, 2000).

L'intégration somato-sensorielle des informations trigéminales se fait dans le thalamus, au niveau des noyaux ventro-postero-médian VPM* et postérieur Po* (Guy *et al.*, 2005; Nosedá *et al.*, 2014). Les neurones de la couches V vont principalement projeter *via* cette voie spinothalamique (Burstein *et al.*, 1990). Ces structures vont ensuite transmettre les informations tactiles et nociceptives jusqu'aux cortex somato-sensoriels primaire et secondaire, permettant l'intégration de la composante sensori-discriminative de la douleur (Nosedá *et al.*, 2011), c'est-à-dire la localisation, l'intensité, la nature ou encore la durée de la douleur. Le thalamus médian participe à l'intégration de la composante cognitivo-émotionnelle de la douleur. En effet, il possède des afférences vers les aires corticales insulaire, cingulaire antérieure, le système limbique dont l'amygdale (Le Bars and Willer, 2004).

Tölle *et al.*, 1999). Enfin, les structures limbiques comme le cortex orbito-frontal participent à l'apprentissage et la mémorisation du contexte lié à la nociception.

La nociception ne peut pas être résumée à un seul système de voies ascendantes. En effet, les messages ascendants sont capables de mettre en jeu au niveau de relais supra-spinaux des contrôles dit descendants de la nociception. Ces contrôles agissent sur différents relais et en particulier sur le relais segmentaire c'est-à-dire dans le cas trigéminal au niveau du Sp5C. Ils sont résumés sur la Figure 6, tirée de la revue de Nosedá et Villanueva, 2017.

C. Contrôles supra spinaux de la transmission du Sp5C

L'intégration du message nociceptif au niveau trigéminal dépend en définitive, de nombreux contrôles, facilitateurs ou inhibiteurs, provenant de structures supra-spinales. Un déséquilibre dans ces boucles de régulation de la nociception peut jouer un rôle clef dans l'apparition et le maintien des douleurs chroniques (cf migraine chronique). Ces contrôles descendants sont constitués de voies issues de différentes structures.

➤ *Contrôles provenant du tronc cérébral*

La substance grise périaqueducale (PAG*), l'aire bulbaire ventro-médiane (RVM*) et le locus coeruleus (LC*) sont des structures clefs dans les contrôles descendants de la douleur.

- *La substance grise périaqueducale PAG*

C'est une structure qui joue un rôle important dans le traitement de l'information nociceptive aussi bien ascendante que descendante. En effet, elle reçoit des afférences de la moelle épinière et du CST via le noyau parabrachial (Dallel *et al.*, 2004) et des informations provenant de l'amygdale et de l'ACC (Gauriau and Bernard, 2002).

Elle contient des neurones exprimant des enképhalines, des peptides (Substance P, CGRP) et du GABA (Beitz, 1982b, 1982a). Elle est sous-divisée en 4 régions : dorso-médiane ; dorso-latérale, latérale et ventro-latérale. C'est la partie ventro-latérale qui reçoit principalement les afférences nociceptives du CST (Menétrey *et al.*, 1982). La PAG a un effet à la fois pro et anti-nociceptif :

- L'activation de neurones glutamatergiques ou l'inhibition des neurones GABAergiques a un effet antinociceptif (Samineni *et al.*, 2017).

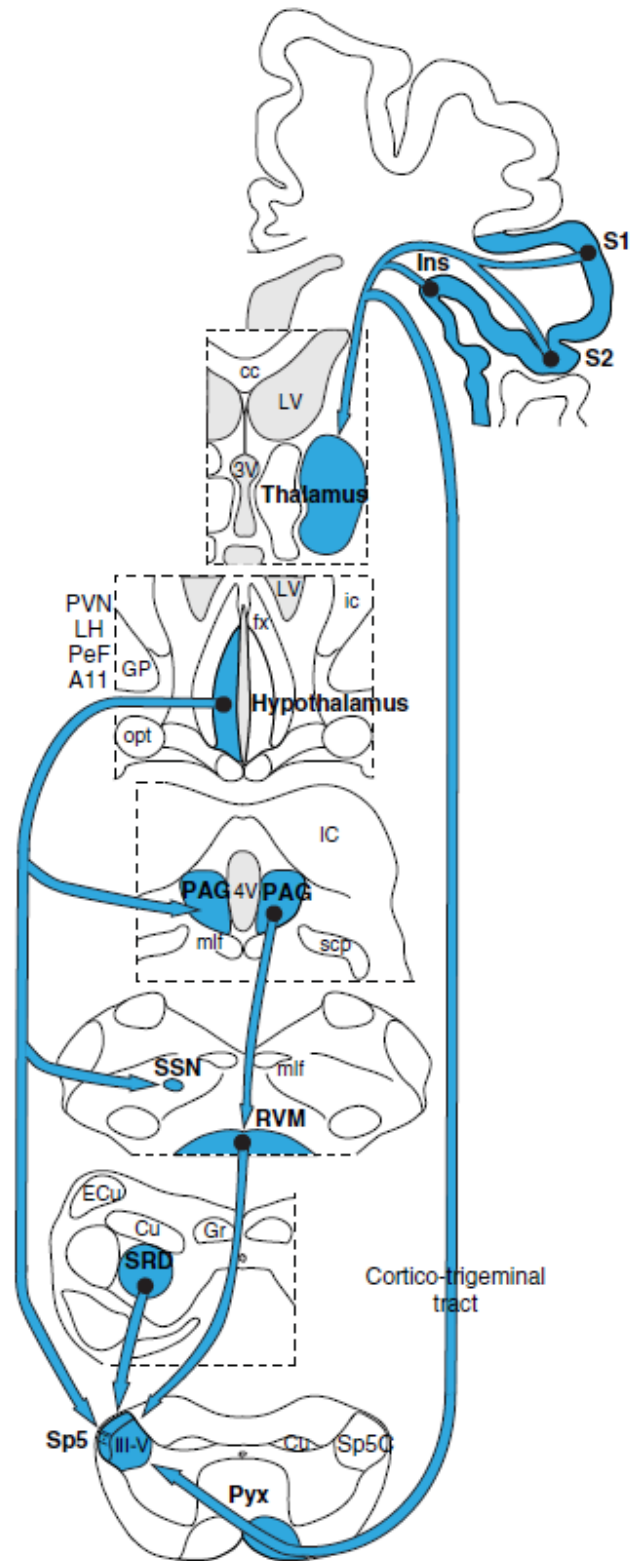


Figure 6 : Les contrôles descendants de la nociception trigéminal. D'après Nosedá et Villanueva, 2017.

A11 : Noyau dopaminergique A11, LC : Locus Coeruleus, LH : Noyau hypothalamique latéral, PAG : Substance grise périaqueducule, RVM : Aire bulbaire ventromédiane, PVN : Noyau hypothalamique paraventriculaire, S1 : Cortex somatosensoriel primaire, S2 : cortex somatosensoriel secondaire, SRD : noyau spino-réticulaire dorsal ; SSN : Noyau salivaire supérieur

- A l'inverse l'inhibition glutamatergique et l'activation GABAergique est pronociceptive (Samineni *et al.*, 2017).

L'action de la PAG sur la nociception trigéminal n'est pas directe mais passe principalement *via* la RVM*.

- **L'aire bulbaire ventromédiane ou RVM**

La RVM est constituée des noyaux médians du raphé magnus et de la formation réticulée adjacente. Elle constitue le relais majeur des contrôles descendants (inhibiteurs ou facilitateurs) en provenance de la PAG, mais elle reçoit également des afférences du noyau parabrachial latéral (Chen *et al.*, 2018). La RVM est composé de 3 types de cellules distinguées en fonction de leur réponse à une stimulation nociceptive : les neurones qui s'activent (cellules « ON »), les neurones qui sont inhibés (cellules « OFF ») et les cellules qui ne répondent pas (cellules « NEUTRES ») (Fields *et al.*, 1995).

- Les cellules « OFF » sont anti-nociceptives, et projettent sur les couches I, II et V du Sp5C (Fields *et al.*, 1995).
- Les cellules « ON » sont pro-nociceptive, et projettent également sur les couches I, II et V du Sp5C (Fields *et al.*, 1995). Une étude récente a permis de montrer que les cellules « ON » GABAergiques étaient pro-nociceptives en inhibant des interneurones enképhalinergiques (François *et al.*, 2017).
- Le rôle des cellules « NEUTRES » dans le contrôle de la nociception n'est pas clairement identifié. Cependant une étude, en 2000, a suggéré que les cellules « NEUTRES » étaient en fait des cellules « ON/OFF » répondant à un territoire différent (Ellrich *et al.*, 2000), résultats qui depuis été confirmés (Khasabov *et al.*, 2015).

Il est à noter qu'une étude réalisée par Edelmayer et collaborateurs en 2009 a permis de montrer que dans un modèle de migraine chez le rat il y avait une augmentation du contrôle facilitateur provenant de la RVM via l'activation des cellules « ON » et l'inactivation des cellules « OFF » (Edelmayer *et al.*, 2009).

- **Le Locus coeruleus**

Ce noyau (LC*) a un rôle clef dans le système nerveux central puisqu'il constitue la principale source de noradrénaline de l'encéphale. Son activité est liée à des fonctions

homéostatiques (Aston-Jones and Waterhouse, 2016; Berridge and Waterhouse, 2003). Il est d'ailleurs connecté avec toutes les zones d'intégration sensorielles, et va donc influencer des fonctions comme l'audition, la vision, la gustation, l'olfaction et dans le cas qui nous intéresse : la somesthésie (McBurney-Lin et al., 2019; Waterhouse and Navarra, 2019). Il est particulièrement reconnu pour son rôle dans les contrôles descendants de la nociception. Les informations sensorielles qui projettent sur le LC passent principalement par le noyau paragigantocellulaire, même s'il existe également des projections directes provenant des couches profondes (V) de la moelle épinière et du Sp5C (Craig, 1992). Ces projections sont majoritairement excitatrices (Ennis *et al.*, 1992). Il reçoit également des informations de la PAG, du cortex préfrontal, de l'amygdale et également de la RVM. Ces projections peuvent être glutamatergiques, cholinergiques, sérotoninergiques, opioïdiques ou corticotrophin release factor (Waterhouse and Navarra, 2019). Le LC est capable de moduler les informations nociceptives au niveau du Sp5C via des projections directes (Fritschy and Grzanna, 1990; Simpson et al., 1997), et il établit des projections au niveau des vaisseaux intra- et extra-crâniens, pouvant ainsi réguler la vasomotricité des vaisseaux méningés qui jouent un rôle important dans la migraine.

Certains contrôles descendants inhibiteurs de la nociception peuvent être mis en jeu expérimentalement, chez l'homme comme chez le rongeur, par des stimulations nociceptives dites hétérotopiques. Il s'agit de contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive (CIDN).

- Les Contrôles Inhibiteurs Diffus de la Nociception (CIDN)

Une stimulation nociceptive sur une partie du corps peut moduler l'intégration d'un message nociceptif provenant d'une autre partie du corps. En effet, selon Hippocrate « deux souffrances survenant en même temps, mais sur des points différents, c'est la plus forte qui fait taire la plus faible ». Ces contrôles sont donc mis en jeu par une stimulation dite « conditionnante », nociceptive et d'une intensité élevée, qui va alors inhiber la douleur provoquée par la première stimulation sur un autre territoire. Il y a d'ailleurs une corrélation entre l'intensité du stimulus conditionnant et le degré d'inhibition réalisé par les CIDN (Willer et al., 1999). Ces contrôles sont dits « diffus » car à partir d'une stimulation nociceptive appliquée sur un territoire (par exemple une patte postérieure), c'est tout le reste du corps qui sera soumis à l'inhibition et même pour des territoires éloignés (par exemple la face).

Les CIDN affectent l'activité nociceptive des neurones WDR, au niveau de la corne dorsale de la moelle ou du noyau trigéminal. Ils mettent en jeu des structures supra-spinales puisqu'ils ne sont plus efficaces chez l'animal spinalisé (Willer et al., 1999). Ces contrôles sont liés à l'activation du noyau spino-réticulaire dorsal (SRD*) (Bouhassira et al., 1992), le noyau parabrachial (Lapirot et al., 2009), le noyau raphé magnus (Chebbi et al., 2014) et le noyau A11 (Lapirot et al., 2011).

Il est à noter que dans le contexte d'un modèle de migraine chronique chez le rat induite par injection répétée de soupe inflammatoire au niveau des méninges, Boyer et collaborateurs ont montré que les CIDN étaient altérés et que leur affaiblissement pouvait donc constituer un facteur de progression de la migraine (Boyer et al., 2014). Des données cliniques suggèrent aussi que la migraine et plus particulièrement dans sa phase chronique est associée à une altération des contrôles inhibiteurs (Sandrini et al., 2006).

➤ *Contrôles à partir de l'hypothalamus*

L'hypothalamus est une structure importante pour l'homéostasie de fonctions telles que les cycles éveil/sommeil, digestion-nutrition, circulation, reproduction ou encore gestion du stress. C'est pour ces raisons que l'hypothalamus a été étudié dans le cadre de la migraine car son implication pourrait expliquer un certain nombre de prodromes (fatigue, difficulté à se concentrer, faim...) (Goadsby *et al.*, 2017). Il est constitué d'un ensemble de sous-noyaux, mais ceux impliqués dans le contrôle de la nociception sont les noyaux A11, paraventriculaire (PVN*) et l'aire perifornicale (PeF*) qui envoient des projections au niveau spinal et trigéminal.

La lésion ou l'inhibition du noyau A11 (situé dans la partie postérieure de l'hypothalamus), source dopaminergique sur le Sp5C (Abdallah et al., 2013), provoque une analgésie trigéminal (Abdallah et al., 2015). Enfin, l'activation du noyau A11 inhibe la transmission nociceptive provenant des méninges (Charbit et al., 2009).

A partir du PVN et PeF hypothalamique, d'autres contrôles descendants viennent moduler les messages nociceptifs au niveau segmentaire. Ces voies descendantes libèrent différents neuromédiateurs (antinociceptifs) tels que l'ocytocine (Kubo et al., 2017), la vasopressine (Honda and Takano, 2009; Kubo et al., 2017) ou les orexines (Date et al., 2000). Par exemple, l'Orexine A *via* l'activation du récepteur orexin 1, est capable d'inhiber les

courants post-synaptiques excitateurs au niveau des couches superficielles de la corne dorsale (Jeon et al., 2015). L'injection intrathécale d'orexine A a un effet analgésique dans des modèles de douleurs inflammatoires comme le formol ou la carragénine (Bingham et al., 2001; Yamamoto et al., 2002).

L'implication de l'hypothalamus dans les contrôles descendants passe aussi indirectement via ses connections avec les structures décrites précédemment à savoir la PAG et la RVM (Millan, 1999).

➤ *Contrôle cortical*

Très tôt, une étude menée par Dubner a permis de mettre en évidence un contrôle inhibiteur du cortex somatosensoriel sur l'activité trigéminal (Dubner, 1967). Les projections du cortex à la fois sur les couches superficielles et profondes du Sp5C mises en jeu lors de cette régulation ont été mises en évidence plus récemment. Elles vont exercer un contrôle excitateur lorsqu'elles proviennent de l'insula, inhibitrice lorsqu'elles proviennent du cortex somatosensoriel S1 (Haque et al., 2012; Nosedà et al., 2010; Zhang et al., 2010).

III. Physiopathologie de la migraine

Malgré les avancées réalisées depuis les années 70 jusqu'à nos jours, la physiopathologie de la migraine reste encore en grande partie méconnue, notamment les mécanismes entraînant le déclenchement des crises de migraine ou encore ceux à l'origine de la progression vers le stade chronique. L'explication du déclenchement des crises a reposé sur deux théories basées sur différentes données cliniques ou expérimentales.

A. La théorie vasculaire

La première théorie avancée par l'américain Harold Wolff date des années 1940. Elle a été élaborée d'après l'observation de la dilatation de l'artère temporale chez certains patients migraineux lors d'une crise (Wolff, 1948). D'après cette théorie, la douleur migraineuse serait due à la vasodilatation des vaisseaux intracrâniens situés dans les méninges (dure-mère et pie-mère). Cette vasodilatation entraînerait une activation des fibres trigéminales innervant les vaisseaux déclenchant la sensation douloureuse caractéristique de la migraine. Des données d'imagerie obtenues par Angiographie Par Résonance Magnétique Haute Résolution chez l'homme sont venues renforcer cette théorie, puisque une vasodilatation des vaisseaux extra et intracrâniens a pu être observée durant la crise dans

l'hémicrâne concerné (Asghar *et al.*, 2011). De plus, des substances connues pour être vasodilatatrices comme les donneurs de NO (Nitroglycérine : NTG*) provoquent une céphalée immédiate chez les patients, et une crise de migraine caractéristique, apparaissant après un certain délai, chez les patients migraineux (Iversen *et al.*, 1989). Enfin l'origine vasculaire des crises a aussi été attestée par l'efficacité des triptans (agonistes de certains récepteurs 5HT1 développés dans les années 1990), traitement spécifique de la crise migraineuse y compris celle induite par un donneur de NO (Flores Ramos *et al.*, 2017). Ces derniers ciblent les vaisseaux méningés, même si on sait aujourd'hui que leur efficacité passe aussi par une action neuronale (Levy *et al.*, 2004).

Cependant, des données d'imageries réalisées chez l'homme montrent des résultats contradictoires. En effet, le Sildénafil (inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5, augmentant la concentration en Guanidine MonoPhosphate cyclique ou GMPC*) est capable d'induire une migraine sans pour autant entraîner de vasodilatation méningée (Kruuse *et al.*, 2003), tandis que le peptide intestinal vasoactif (VIP*) est capable d'induire une dilatation des artères méningées sans entraîner de crise de migraine (Rahmann *et al.*, 2008). Enfin, la vasodilatation des vaisseaux provoquée par les donneurs de NO apparaît à distance de la céphalée migraineuse, ce qui ne permet pas de faire un lien direct entre les 2 événements (Schoonman *et al.*, 2008). Se pose donc la question de savoir si la vasodilatation est un déclencheur clef ou un épiphénomène lors d'une attaque de migraine. Cependant, comme évoqué dans le paragraphe sur la composante génétique de la migraine, les études de génomique à très large échelle ont mis en évidence des polymorphismes associés aux tissus vasculaire qui sont corrélés à un risque plus élevé de migraine. Ces données remettent en perspective l'hypothèse vasculaire dans la physiopathologie de la migraine (Gormley *et al.*, 2016).

B. La théorie de l'inflammation neurogène

Une revue récente de Ashina *et collaborateurs* (2019) permet de faire le point sur cette théorie qui repose en partie sur la découverte et l'étude du rôle de peptides dans un mécanisme, appelé l'inflammation neurogène. Au niveau des afférences méningées du système trigéminovasculaire, ont été mis en évidence 3 neuropeptides : la substance P (SP*), le calcitonin-gene-related peptide (CGRP*) et le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP*).

La SP est exprimée dans une grande partie du système nerveux central mais également à la périphérie (May and Goadsby, 2001). Impliquée dans la transmission des messages douloureux, elle est libérée par les fibres C au niveau des couches superficielles du Sp5C et agit en se fixant sur le récepteur Neurokinin 1 (NK1). Elle est aussi libérée à la périphérie (réflexe d'axone) où elle participe à la sensibilisation des afférences primaires en situation d'inflammation. La stratégie thérapeutique ciblant le récepteur NK1, prometteuse d'après les données obtenues chez l'animal, s'est cependant montrée décevante en clinique dans le cas de la migraine (Diener, 2003) et dans le traitement d'autres types de douleur (Hill, 2000).

Le CGRP a été le deuxième neuropeptide identifié dans le système trigéminal. Un grand nombre de fibres C exprimant ce peptide sont retrouvées au niveau des méninges (avec une co-localisation avec la SP pour une petite partie d'entre elles). Il est à noter que les fibres A δ n'expriment pas le CGRP alors qu'elles sont pourvues de récepteurs au CGRP (Calcitonin-receptor like CRL* et receptor activity-modifying protein 1 RAMP1*). Ce résultat suggère que la libération de CGRP par les fibres C peut également influencer (sensibiliser) les fibres A δ se trouvant à proximité.

Le PACAP, découvert en 1989, est également retrouvé autour des fibres trigéminales entourant les vaisseaux méningés, dans le ganglion trigéminal et dans le Sp5C (Uddman et al., 2002). Alors que sa concentration plasmatique augmente en réponse à la stimulation électrique des méninges (Zagami et al., 2014), elle diminue au niveau du ganglion trigéminal lors d'une inflammation méningée (Vollesen et al., 2018). Ces résultats suggèrent une implication du PACAP différente en fonction de la nature du stimulus.

Ces neuropeptides, libérés au niveau des méninges, vont pouvoir activer la libération de substances pro-inflammatoires telles que l'histamine, la sérotonine, les prostaglandines ou encore le monoxyde d'azote par les cellules se trouvant au niveau des vaisseaux méningés à savoir les cellules endothéliales, les macrophages et les mastocytes (Messlinger and Dux, 2017). Cette inflammation pourrait donc entraîner le déclenchement des crises de migraine en activant et/ou sensibilisant les nocicepteurs méningés (Strassman et al., 1996). Des modèles de migraine chez l'animal viennent conforter cette hypothèse : en effet, l'injection de substances telles que les donneurs de monoxyde d'azote NO (nitroglycérine, isosorbide dinitrate) est capable d'induire la dégranulation de mastocytes au niveau des méninges (Ferrari et al., 2016). De plus, ce même modèle provoque une inflammation chez l'animal qui

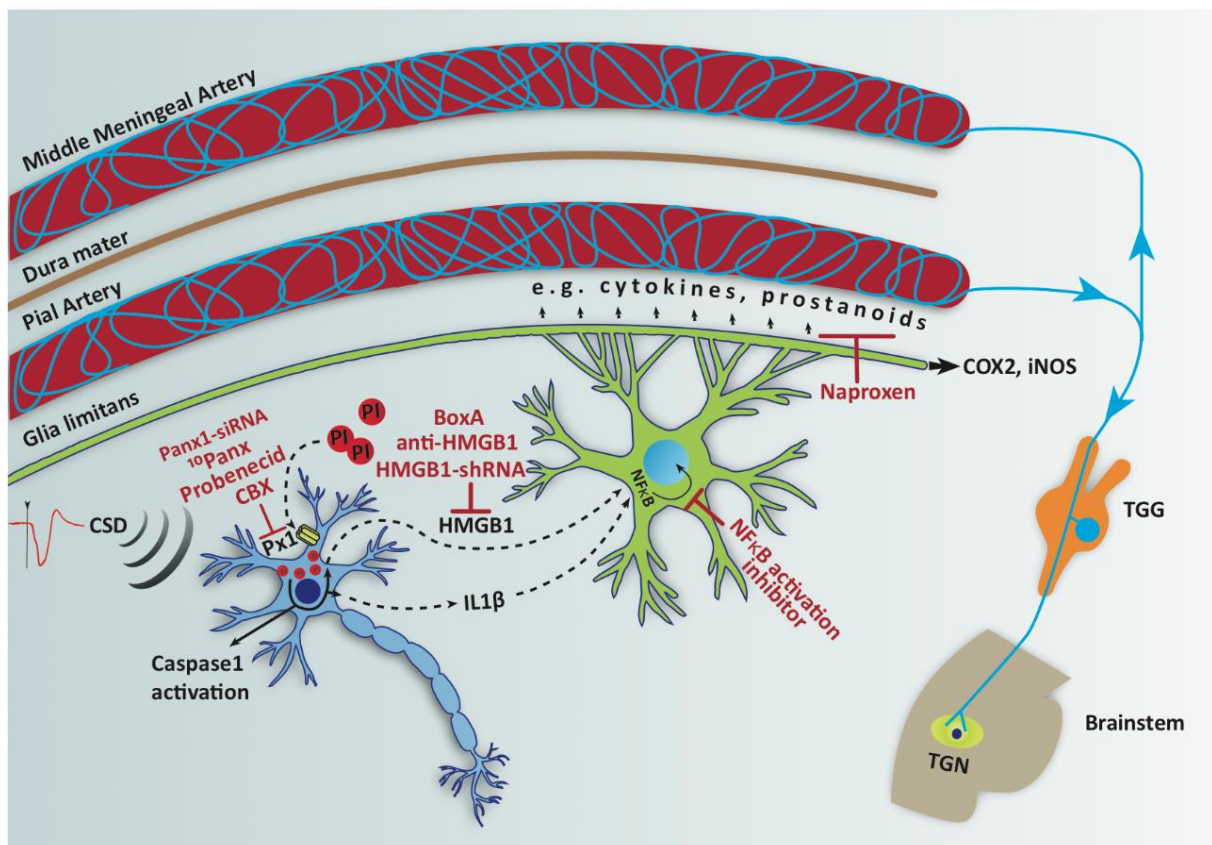


Figure 7 : La dépression corticale envahissante D'après Karatas *et al.* 2013.

(1) Dépression Corticale Envahissante (Libération ion K^+/H^+ , glutamate...); (2) Ouverture canaux pannexin1 (Pnx1) neuronaux, entraîne activation de la caspase-1; (3) Libération de médiateurs pro-inflammatoires (par exemple, HMGB1, IL-1); (4) Activation astrocytes (via NF- κ B) qui vont exprimer COX2 et de iNOS.; (5) Cytokines, Prostanoides et le NO sont ensuite libérés favorisant activation prolongée des fibres trigéminales.; (6) Inflammation durale stérile accompagnée d'une dégranulation des mastocytes. Les barres en T rouges indiquent les étapes où la cascade a été interrompue par des inhibiteurs.

se produit 2h après l'injection, ce qui correspond au délai observé avant l'arrivée de la crise de migraine chez le patient (Reuter et al., 2001).

L'allodynie (hypersensibilité cutanée), retrouvée chez un grand nombre de patients pendant la crise de migraine (Louter et al., 2013) est également un élément en faveur d'un mécanisme inflammatoire dans la migraine qui entraîne l'activation et la sensibilisation des afférences trigéminales périphériques (allodynie d'origine périphérique) mais aussi peut induire la sensibilisation des neurones de second ordre (allodynie d'origine centrale) situés au niveau de Sp5C. En effet, ces neurones reçoivent à la fois des afférences méningées et des afférences cutanées. L'importance de la composante inflammatoire dans la migraine est aujourd'hui admise comme un élément clef dans la douleur liée à la crise migraineuse. Cependant, la cascade d'évènements amenant au déclenchement de cette inflammation demeure inconnue, et c'est justement l'identification de ce « générateur » de migraine qui serait une grande avancée dans la compréhension de la migraine. La dépression corticale envahissante, la contribution du système nerveux parasympathique ou encore un dysfonctionnement du tronc cérébral sont actuellement discutés en tant que déclencheurs de cette inflammation et donc de la migraine.

C. La dépression corticale envahissante

La dépression corticale envahissante (DCE*) est un phénomène précédant la crise migraineuse chez le patient. Elle a été mesurée pour la première fois en 1944 par Leao chez le lapin (Leao, 1944). La DCE débute par une onde de dépolarisation neuronale et gliale, accompagnée d'importantes modifications ioniques, qui se propage lentement (2 à 6 mm/min) à la surface du cortex. Cette vague de dépolarisation est suivie d'une chute de l'activité neuronale, d'où son nom de DCE. Elle a pour conséquence une augmentation de l'afflux sanguin et une extravasation de substances algogènes comme des ions H⁺ et K⁺, du monoxyde d'azote (NO*), la protéine High Mobility Group Box 1 (HMGB1*) ou l'interleukine 1 β (IL-1 β *) qui vont aller activer et sensibiliser les afférences trigéminales (Bolay *et al.*, 2002, Karatas *et al.*, 2013). Les astrocytes ont été impliqués dans les mécanismes de la CSD, étant donné leur rôle essentiel dans la régulation du K⁺ extracellulaire et la génération d'ondes de Ca²⁺ in vitro (nous décrivons plus en détail ces mécanismes dans la partie dédiée aux astrocytes). Ces ondes se propagent lentement dans le réseau des astrocytes, via leurs jonctions communicantes, à une vitesse similaire à celle de la CSD (Rovegno and Sáez, 2018).

Cette DCE peut être reproduite expérimentalement via différentes stimulations : un stimulus chimique (application de KCL sur le cortex), des stimulations électriques ou mécaniques sur le cortex ou même une vasodilatation. La DCE constitue un modèle de migraine couramment utilisé. Chez le rongeur, de nombreuses études ont montré que la DCE entraînait une activation immédiate et différée des neurones périphériques (ganglion trigéminal) et centraux (Sp5C) (Bolay et al., 2002; Zhang et al., 2010, 2011c). Par ailleurs, des études réalisées dans des modèles de migraine génétique (Pietrobon and Brennan, 2019) ou par injection d'un donneur de NO (Bates et al., 2010) chez la souris ont montré un abaissement du seuil de déclenchement de la DCE.

Une étude présentant le mécanisme et la cascade des événements se produisant à la suite de la DCE a été publiée par Karatas et collaborateurs en 2013. (Figure 7). En réponse à la DCE, notamment au relargage de K⁺ et de glutamate, s'effectue une ouverture transitoire des canaux pannexin1 (Pax1*) neuronaux, avec activation ultérieure de la caspase-1 et la libération de médiateurs pro-inflammatoires (par exemple, HMGB1, IL-1). Les astrocytes sont activés (via NF-κB) et expriment COX2 et iNOS. Les cytokines, les prostanoïdes et le NO sont ensuite libérés dans l'espace sous-arachnoïdien, favorisant ainsi l'activation prolongée des fibres trigéminales. S'installe ensuite une inflammation durale stérile—accompagnée d'une dégranulation des mastocytes, alors que le réflexe trigémino-parasympathique provoque le relargage de CGRP ou encore de NO (Reuter *et al.*, 1998) et ainsi une dilatation tardive et soutenue des artères méningées.

La DCE est associée à l'aura rapportée chez environ un tiers des patients, qui a lieu spontanément dans le cortex chez les patients migraineux juste avant la crise de migraine (Bowyer *et al.*, 2001). Il n'existe toujours pas de lien direct entre la DCE et la migraine chez l'homme, et la question de savoir comment la DCE elle-même est déclenchée. En outre, la majorité des patients migraineux ont des crises de migraine sans aura (70%) pour lesquels n'a pas été mise en évidence de DCE.

D. La contribution du système parasympathique

Chez un grand nombre de patients, existent des symptômes liés à l'activation du système nerveux autonome comme le larmoiement, la congestion nasale, la transpiration etc...(Lai et al., 2009)

Ces manifestations suggèrent l'implication du système parasympathique dans la migraine. Les déclencheurs de migraine, tels que le stress, peuvent activer de multiples zones hypothalamiques, limbiques et corticales, capables de mettre en jeu les neurones parasympathiques du noyau salivaire supérieur (SSN*)(Burstein and Jakubowski, 2009). Le SSN établit des contacts avec les neurones parasympathiques du ganglion sphéno-palatinal (SPG*), qui envoie des projections au niveau des vaisseaux méningés. La vasodilatation et la libération locale de molécules inflammatoires par ces derniers activent les nocicepteurs méningés (Suzuki and Hardebo, 1993). Ainsi l'activation du SSN est capable de moduler l'activité des neurones trigéminaux (Akerman et al., 2012). L'hypothèse de l'intervention du système parasympathique est également soutenue par l'efficacité du blocage de l'activité du ganglion sphéno-palatinal dans le traitement de la céphalée migraineuse (Yarnitsky et al., 2003).

IV. Traitements

Les traitements anti-migraine peuvent se résumer à deux catégories : les traitements de crise, qui doivent être pris dès le début des symptômes de la crise migraineuse pour être efficaces, et les traitements de fond dont l'objectif est de diminuer la fréquence (et aussi l'intensité) des crises.

A. Traitements de crise

➤ *Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et paracétamol*

L'aspirine, et autres AINS (Ketoprofène, flurbiprofène, naproxène etc..) sont les traitements le plus couramment utilisés, avec le paracétamol, pour le traitement aiguë des crises de migraine (Pardutz and Schoenen, 2010). Plusieurs études ont démontré contre placebo l'efficacité de l'aspirine (Chabriat et al., 1994; Taneri and Petersen-Braun, 1995)

➤ *Le paracétamol*

Le paracétamol est très largement utilisé dans la migraine, en particulier en automédication, car son potentiel toxique est peu connu des patients. Son efficacité, seul ou en association avec codéine, caféine ou encore aspirine a été montré lors d'études cliniques (Derry and Moore, 2013; Moore et al., 2015).

➤ *Triptans*

Les triptans sont les premiers médicaments spécifiquement développés pour traiter la migraine. Ils ciblent les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1B/D} présents au niveau des méninges et ainsi provoquent une vasoconstriction de ces vaisseaux. Ils ont aussi une affinité plus faible pour d'autres récepteurs sérotoninergiques, comme le 5-HT_{1A}, 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}. Des études ont montré également une action sur la transmission trigéminal, en agissant sur les récepteurs présynaptiques 5-HT_{1D} (Ho *et al.*, 2014). Cependant ils peuvent avoir des effets indésirables cardiovasculaires *via* leur liaison au récepteur 5-HT_{1B} qui peuvent limiter leur prescription. Les triptans sont très efficaces s'ils sont pris dès le début de la crise de migraine (Burstein and Jakubowski, 2004), mais lorsque la crise est installée, ils perdent de leur efficacité.

➤ *Ditans*

Les ditans sont des agonistes des récepteurs sérotoninergiques tout comme les triptans, mais avec une spécificité pour les récepteurs 5-HT_{1F}. La fixation de l'agoniste au récepteur présynaptique va permettre de diminuer le relargage de peptide et ainsi de prévenir l'activation et la sensibilisation à la fois des nocicepteurs périphériques mais également au niveau central. Ils ont été développés pour convenir aux patients ayant des contre-indications aux triptans qui présentent un risque cardiovasculaire. Le Lasmiditan est actuellement en phase III et les premiers résultats semblent prometteurs, offrant une nouvelle molécule thérapeutique efficace pour traiter la crise de migraine (Moreno-Ajona *et al.*, 2019).

B. Traitements de fond

Les traitements de fonds de la migraine sont pris de façon continue afin de diminuer le nombre et l'intensité des crises. Plusieurs classes thérapeutiques sont indiquées, même si le mécanisme d'action n'est pas toujours clair. Elles permettraient de « normaliser » l'hyperexcitabilité neuronale décrite dans la migraine.

➤ *Béta-bloquants*

Le traitement de première intention lors de la mise en place d'un traitement de fond sont les béta-bloquants. De nombreuses études ont validé leur efficacité, notamment le propranolol qui permet une réduction de près de 50% des crises (Nadelmann *et al.*, 1986; Rosen, 1983; Shimizu, 2009). La découverte de l'action antimigraineuse des bêta-bloquants est fortuite, et a été constatée chez un patient migraineux traité pour un angor (Wykes, 1968).

A l'heure actuelle les mécanismes précis de l'efficacité des bêta-bloquants dans la migraine restent peu connus. Les bêta-bloquants sont des molécules très lipophiles, qui peuvent donc passer la barrière hémato-encéphalique et avoir un effet sur les récepteurs au niveau central. Une étude réalisée dans un modèle de migraine chez le rat par injection répétée de soupe inflammatoire a permis de montrer que le propranolol en traitement de fond permettait d'éviter la sensibilisation des neurones du CST et de diminuer l'expression de c-fos dans la RVM et également dans le Locus Coeruleus (Boyer et al., 2017).

➤ *Antiépileptiques*

Les antiépileptiques sont utilisés lorsque le patient a une contre-indication à l'utilisation de bêta-bloquants ou lorsque celui-ci est inefficace. Ils ont prouvé leur efficacité contre placebo et sont couramment utilisés en traitement de fond de la migraine. Le principal antiépileptique utilisé dans le traitement de la migraine est le topiramate (Silberstein, 2015).

Ils sont efficaces dans la réduction de la durée et de l'intensité des crises (Linde et al., 2013). Ils peuvent agir à différents niveaux : inhiber les canaux calciques et ainsi limiter la libération de neurotransmetteurs excitateurs, ou augmenter la libération de GABA-

➤ *Antidépresseurs*

Certains antidépresseurs ont démontré une efficacité dans le traitement prophylactique de la migraine, mais ils restent des molécules de second choix de par leurs effets indésirables non négligeables. Ainsi l'amitriptyline, un antidépresseur tricyclique (Xu et al., 2017), ou la venlafaxine (Silberstein, 2015) ont démontré leur efficacité comme traitements préventifs. Ces traitements présentent également l'avantage de réduire les troubles psychiatriques (anxiété/dépression) associés au stade chronique de la migraine.

➤ *La toxine botulinique*

La toxine botulinique de sérotype A (onabotulinumtoxin A) est un traitement utilisé uniquement dans le traitement de la migraine chronique puisqu'elle n'a montré aucune efficacité chez les patients épisodiques. L'étude clinique PREEMPT-2 a montré qu'une injection trimestrielle de toxine botulinique de type A permettait de réduire significativement le nombre de jours de céphalée par rapport aux contrôles (Diener et al., 2010). Son mode d'action n'est pas complètement connu. Cependant, certaines études suggèrent que son efficacité pourrait ne pas être uniquement périphérique, limitée au site d'injection, mais également avoir un effet central via un transport axonal. Les mécanismes sous-jacents aux

effets sur la migraine chronique pourraient ainsi inclure une modulation de la libération de neurotransmetteurs ainsi qu'une modifications de l'expression de récepteurs présent à la membrane synaptique au niveau central (Do *et al.*, 2018).

➤ *Les anti-CGRP*

La stratégie visant à cibler le CGRP provient des découvertes concernant son implication dans l'inflammation neurogène lors de la migraine. La première classe thérapeutique ciblant le CGRP a été celles des antagonistes du récepteur au CGRP, les gépants. Ces composés avaient démontré une efficacité prometteuse en tant que traitement de crise, notamment le telcegepan (Ho *et al.*, 2008), mais ont cependant été retirés des études cliniques après des premières données montrant une hépato-toxicité chez l'homme (Ho *et al.*, 2014). De nouvelles molécules ont été développées en essayant d'éviter cet effet hépatotoxique, notamment le Rimegepant et l'Ubrogepant.

Le potentiel thérapeutique des anti-CGRP étant important, une nouvelle stratégie visant son récepteur à l'aide d'anticorps a été testée. Ainsi l'eptinezumab, l'erenumab, le galcanezumab, et le fremanezumab ont fait l'objet d'études cliniques (Han *et al.*, 2019). Leur efficacité en tant que traitement de crise et traitement de fond a été approuvée par les Etats-Unis et par l'Europe, avec l'autorisation de commercialiser l'Erenumab. En Europe, il reste cependant réservé aux patients en échec thérapeutique et souffrant d'au moins 4 crises de migraines par mois (Markham, 2018). D'une manière intéressante, les anti-CGRP ont démontré leur efficacité non seulement chez les patients souffrant de migraine épisodique, mais également chez les patients souffrant de migraine chronique, et même chez ceux souffrants de migraine chronique avec abus médicamenteux, réputés pour être les cas les plus difficiles à traiter (Han *et al.*, 2019; Lipton *et al.*, 2019; Tepper *et al.*, 2019)

Les anti-CGRP étant des anticorps, ils ne peuvent pas passer la barrière hémocéphalique (Edvinsson and Warfvinge, 2019), ce qui signifie que leur efficacité passe uniquement par un mécanisme périphérique, au niveau du ganglion trigéminal notamment. Cet élément dans un contexte de migraine chronique est très intéressant, puisque jusqu'à présent la migraine chronique était considérée comme une pathologie « centrale » et que l'élément périphérique n'était que secondaire. L'efficacité de l'Erenumab chez les patients chroniques prouve que même à un stade avancé de la pathologie, les éléments périphériques jouent un rôle significatif dans le déclenchement des crises de migraine.

	Episodic Migraine	Evolving, Intermediate State	Chronic Migraine
Clinical characteristics	Lower frequency headaches (lasting 4–72 hours on <15 days/month) ^a Associated symptoms include lateralized pulsating pain, pain made worse by routine physical activity, nausea, photophobia, and/or phonophobia More severe pain	Approximately 3% evolve per year	Higher frequency headaches (≥15 days/month for >3 months; meet criteria for episodic migraine on ≥8 days/month or believed by patient to be a migraine and relieved by acute migraine medication) ^a Fewer associated symptoms Less severe pain Often, acute analgesic overuse
Quality of life	Disability associated with acute attacks	More disabling	Prolonged, pervasive disability
Pathology and functional correlates	Alterations in periaqueductal gray matter iron homeostasis ^b Increased blood flow and activity in pons and other areas during migraine ^{c,d} Some baseline cortical hyperexcitability ^e Alteration in brain processing of cutaneous pain ^f	More pervasive, severe, or enduring changes	Alterations in periaqueductal gray matter iron homeostasis possibly progressive ^b Increased activity in pons, other areas in interictal period ^c Excessive baseline cortical hyperexcitability ^e More substantial alteration in brain processing of cutaneous pain ^f
Treatment	Triptans often effective Topiramate often effective Presence of risk factors for progression may influence treatment	Attempt to prevent chronification	Difficult to treat; triptans frequently ineffective Topiramate may be effective OnabotulinumtoxinA proven efficacious and tolerable

Tableau 2 : Vue d'ensemble des caractéristiques associées à la migraine épisodique et chronique ; D'après Aurora et al. ; 2017

V. La migraine chronique

A. Généralités

La progression de la migraine est un phénomène qui se caractérise par une augmentation de la fréquence des crises. La migraine peut évoluer selon un stade dit épisodique (ME*) qui se traduit par des crises s'étageant du stade à basse fréquence (0 à 9 jours de crises/mois) jusqu'au stade dit à haute fréquence (9-14 jours de crises/mois). Enfin le stade de migraine chronique proprement dit (MC*) est défini selon IHS lorsque le patient subit plus de 15 jours de crises de céphalée par mois (dont au moins 8 crises de migraine). Au stade de MC, les crises sont également plus longues et plus intenses, et l'efficacité des traitements est très réduite voire nulle (Bigal and Lipton, 2008). Cette évolution d'un stade épisodique, épisodique à haute fréquence puis migraine chronique peut évoluer sur plusieurs mois ou années, et est bi-directionnelle.

La prévalence de la migraine chronique est d'environ 1-2% dans la population générale et 8% chez les migraineux, avec une prévalence maximale entre 18 et 29 ans et entre 40 et 50 ans (Buse *et al.*, 2012). Chaque année, 2 à 3% de patients souffrant de migraine épisodique voient une progression de la pathologie vers le stade chronique (Bigal and Lipton, 2008). La transformation de la migraine vers une forme chronique entraîne une altération conséquente de la qualité de vie du patient, aussi bien sur sa vie de famille que d'un point de vue professionnel ce qui entraîne également un coût sociétal important (Bigal *et al.*, 2008; Buse *et al.*, 2012). En effet, même si la prévalence dans la population générale semble assez faible, cette proportion de patients représente une grande partie de l'impact sociétal associé à la migraine. Les mécanismes qui sous-tendent cette transformation de la pathologie sont aujourd'hui encore peu connus. La mauvaise connaissance de cette transformation (progression) explique sans doute pourquoi la migraine chronique est aujourd'hui insuffisamment prise en charge et manque de traitements spécifiques. Cependant des facteurs de risque de progression ont été identifiés, nous allons les décrire dans le paragraphe suivant.

B. Les facteurs de risque

➤ *La répétition des crises*

Le premier facteur de chronicisation est la fréquence des crises de migraine (Bigal and Lipton, 2008). En comparant le nombre de crise des patients entre ceux devenus chroniques ou non que Scher et al., 2003 ont montré que le nombre de crises par mois est un des facteur les plus importants dans la transformation de la migraine. La fréquence pourrait ainsi être un marqueur de l'évolution de la maladie et donc plutôt vu comme une conséquence.

Cette observation peut aussi être interprétée comme la cause : la répétition des crises et donc l'activation répétée des différentes aires cérébrales lors d'une crise de migraine vont amener à la sensibilisation des circuits et des relais nociceptifs, comme par exemple la PAG (Knight and Goadsby, 2001; Mainero *et al.*, 2011; Solstrand Dahlberg *et al.*, 2018; Welch *et al.*, 2001). Ce processus conduirait à une prédisposition plus importante à une future douleur, expliquant la récurrence des crises.

➤ *L'abus médicamenteux*

Le deuxième facteur de risque est l'abus médicamenteux. L'abus médicamenteux est défini par l'IHS comme la prise de plus de 10 médicaments anti-migraineux par mois pendant plus de 3 mois consécutifs. Ce facteur est à prendre en considération puisque près de 80% des patients MC présentent une surconsommation de médicaments (Tepper, 2017). Cette forte proportion de migraineux sous abus médicamenteux est même considérée comme une population à part entière sous le terme de « Medication Overuse Headache » (MOH*). Dans le cas de migraine chronique par abus médicamenteux, le sevrage médicamenteux se révèle efficace pour diminuer la fréquence des crises (Evers and Marziniak, 2010).

Cependant, l'abus médicamenteux en lui-même ne semble pas suffisant pour induire une migraine chronique, puisque des études cliniques ont montré qu'une consommation importante et régulière d'antalgiques chez des sujets non migraineux n'entraînait pas l'apparition de MOH (Bowdler et al., 1988)

➤ *L'allodynie cutanée*

L'allodynie cutanée, définie comme la perception d'une douleur à la suite d'une stimulation non nociceptive, comme le tact léger, est présente chez les patients migraineux

chronique dans une proportion pouvant aller jusqu'à 80% (Bigal and Lipton, 2008b; Bigal et al., 2008). De plus, il a été démontré que ce symptôme, présent aussi aux stades aigus (épisodiques), était un excellent facteur prédictif de la transformation de la migraine vers le stade chronique (Buse et al., 2012; Guy et al., 2010; Louter et al., 2013).

L'apparition d'une allodynie cutanée céphalique témoigne de la sensibilisation centrale du CST, mais elle peut s'étendre aux territoires extracéphaliques, ce qui suggère une sensibilisation de structures supra-segmentaires, comme le thalamus (Burstein et al., 2010). L'activation de ces structures peut entraîner également une aggravation de l'allodynie céphalique qui peut perdurer entre les crises de migraine (Bernstein and Burstein, 2012; Burstein et al., 2010).

➤ *Anxiété/dépression*

La dépression et l'anxiété sont des comorbidités associées à la migraine d'une manière générale (Peres et al., 2017). Cependant, elles sont plus présentes chez les patients atteints de migraine chronique par rapport à ceux souffrant de migraine épisodique. La dépression est d'ailleurs un facteur prédictif significatif de l'apparition de la migraine chronique (OR = 1,65, IC à 95% de 1,12 à 2) (Ashina et al., 2012). Enfin, plus la dépression dont souffre le patient est importante plus le risque de transformation vers une migraine chronique augmente (Ashina et al., 2012).

Les cellules gliales

I. Historique de la glie

Le terme de « neuroglie » a été évoqué pour la première fois par le scientifique Rudolf Virchow en 1848 qui décrit un tissu connectif, contenant peu ou pas de cellule. La conception d'un tissu bien distinct et « moins » important que la partie neurale à proprement parler, s'est peu à peu répandue et a été admis au sein de la communauté scientifique. Il faudra attendre la fin du 19^{ème} siècle et le développement de techniques d'histologies plus performantes pour pouvoir observer pour la première fois les cellules gliales, avec notamment les travaux de Camillo Golgi et de Santiago Ramon y Cajal [pour revue voir Haydon 2016; Kettenmann et Verkhratsky 2008].

En 1893, le terme d'« astrocyte » est proposé pour la première fois par Mihály Lenhossék, anatomiste et histologiste hongrois, qui décrit des cellules gliales en forme d'étoile. Entre 1889 et 1893, Rudolf von Kölliker et William L. Andriezen distinguent une glie fibreuse (dans la substance blanche) et une glie protoplasmique (dans la substance grise), d'où la notion d'astrocyte fibreux et protoplasmique. En 1913 Santiago Ramón y Cajal, en mettant au point une nouvelle coloration, décrit un troisième élément qui n'est ni un neurone ni un astrocyte. Ces travaux sont repris par Pio del Río Hortega qui démontre que ce troisième élément est en fait constitué de deux types cellulaires : les oligodendrocytes et la microglie. Il publie deux articles entre 1919 et 1920 intitulés « The Third Element of the Central Nervous System », suivis ensuite par un 3^{ème} article en 1921 « Histogenesis and Normal Development: Exodus and Regional Distribution of Microglia » [voir pour revue Sierra et al. 2016]. Pour Pio del Río Hortega les oligodendrocytes appartiennent à la famille des cellules gliales d'origine ectodermique alors que les cellules microgliales sont d'origine mésodermique et ont des propriétés migratoires et de phagocytose. Les différents types de cellules gliales sont donc liés à leurs caractéristiques morphologiques, leurs fonctions physiologiques et leur origine embryologique. A l'heure actuelle, on distingue la macroglie de la microglie. La macroglie regroupe les différents types d'astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes, ainsi que les cellules gliales du système nerveux périphérique à savoir cellules de Schwann et les cellules satellites. La microglie est représentée par les cellules microgliales.

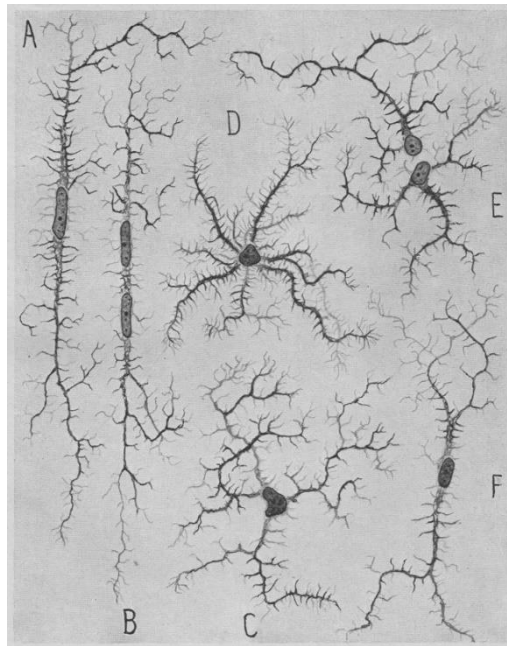


Figure 8 : Dessin des différents types de cellules microgliales illustrées par Rio Hortega en 1932. A : Une cellule bipolaire en forme de tige; B : cellule allongée à deux noyaux; C : cellule multipolaire ramifié ; D : cellule multipolaire avec appendices épineux; E : couple isogénique [«microglie en division»]; F : cellule bipolaire à appendices fourchus.

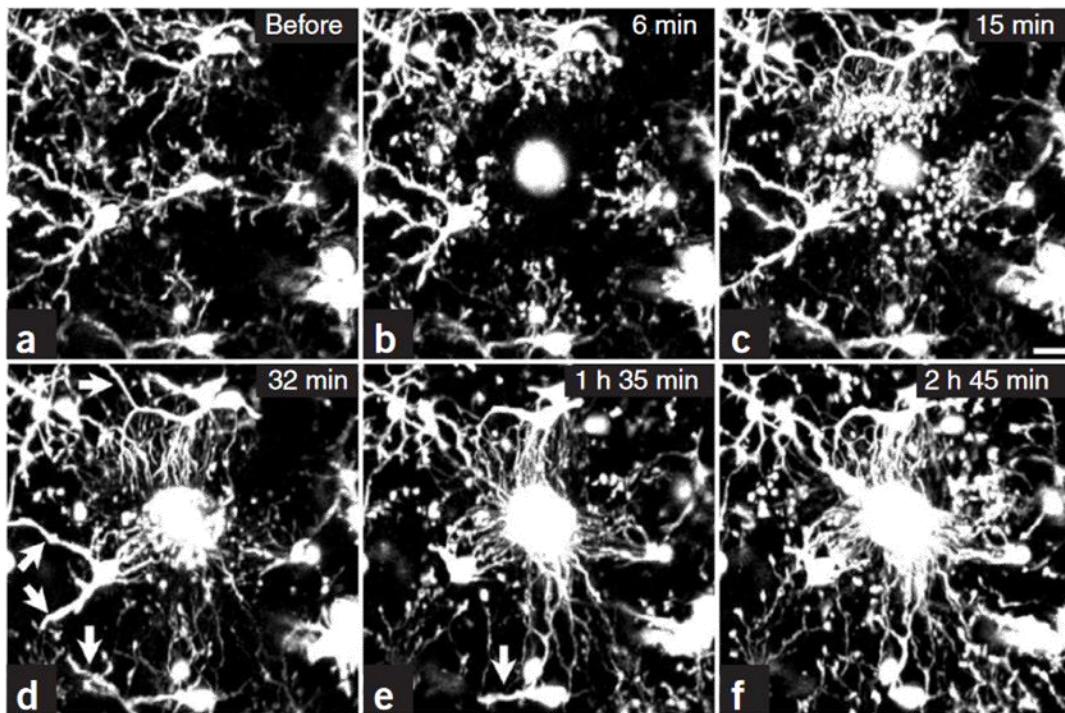


Figure 9 : Dynamique de la réponse de la microglie en réponse à une lésion (Davalos et al., 2005) Après la création d'une lésion localisée dans le cortex par un laser bi-photonique (au centre de l'image), les cellules microgliales environnantes vont immédiatement étendre leurs prolongements en direction de la zone lésée. Ces prolongements vont entourer la zone détruite. En même temps que l'extension des prolongements vers la lésion, on peut observer une rétraction des prolongements microgliaux se situant du côté opposé à celui de la lésion (flèches en d et e). La barre d'échelle représente 10 μm .

II. Les différents types de cellule gliales

A. La microglie

Les cellules microgliales ont fait l'objet de nombreuses études qui montrent l'importance de ces cellules dans la physiologie du système nerveux central et notamment dans le développement de douleurs chroniques.

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du système nerveux central. Elles représentent environ 10 % des cellules gliales du cerveau (Perry, 1998). Depuis leur mise en évidence par Pio del Rio-Hortega (Figure 8), de nombreux travaux ont démontré leur fonction macrophagique dans le tissu nerveux. Ces cellules proviennent de progéniteurs macrophagiques qui migrent dans le système nerveux central dans la période péri-natale (Alliot et al., 1999). Ces progéniteurs macrophagiques vont ensuite se multiplier et donner naissance à des progéniteurs microgliaux qui se différencieront en cellule microgliales matures *in situ*. L'hypothèse de l'origine mésodermique, avancé par Pio del Rio-Hortega, a longtemps été débattue avant qu'une étude relativement récente n'en apporte la preuve. En effet, il a été montré que chez des souris, l'absence du facteur de transcription Pu.1 (Iwasaki et al., 2005), un régulateur clef du développement des cellule hématopoïétiques, entraînait la perte totale de cellules microgliales (Beers et al., 2006; Smolders et al., 2019).

Il a été considéré pendant longtemps qu'en condition physiologique, ces cellules étaient seulement « quiescentes » et ne participaient pas au fonctionnement du SNC. Ce n'est que plus récemment que leur rôle dans les conditions physiologiques a été montré. En effet, les cellules de la microglie sont très dynamiques et interagissent continuellement avec leur environnement (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005, Figure 9).

➤ Physiologie

En tant que macrophages, les cellules microgliales possèdent les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des agents infectieux comme les Toll-Like récepteurs (TLR*), les récepteurs du complément (Récepteur du complément 3 (CR3*) encore appelé Cluster of differentiation Molecule 11 (CD11b*)), le Macrophage-1 antigène ou encore Intégrine alpha M. Ces différents récepteurs permettent à la microglie d'être immédiatement activée en cas d'infection touchant le SNC, de détecter également les éléments étrangers présents dans le SNC et de les phagocyter.

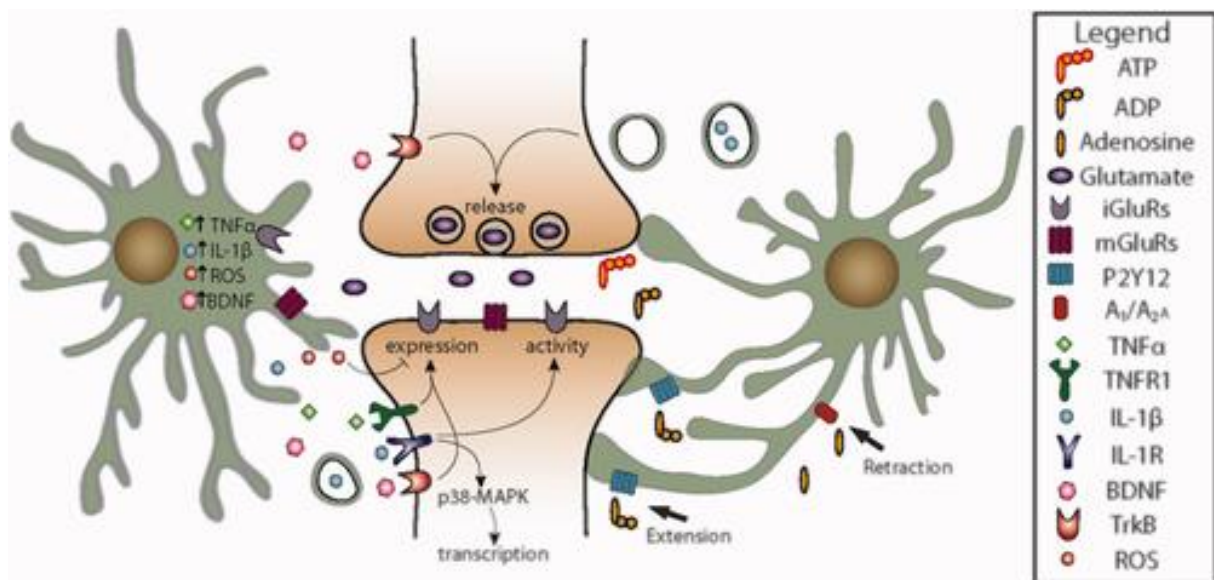


Figure 8 : Mécanismes de communication entre la microglie et les neurones (d'après Yok et al., 2018)

La microglie détecte l'activité synaptique via les récepteurs au glutamate (métabotrope : mGluR et ionotropiques iGluR) ainsi les taux d'ATP / ADP via les récepteurs P2YR et A1A/A2A. En réponse à la stimulation de P2Y12, la microglie étend rapidement des prolongements vers la synapse, tandis que la signalisation par l'adénosine déclenche leur rétractation. Le contact cellule-cellule peut freiner l'activité des neurones via un remodelage de la matrice extracellulaire, une phagocytose des composants synaptiques ou encore une libération locale de modulateurs synaptiques. Les niveaux de glutamate et d'ATP régulent également la production microgliale de TNF- α , IL-1 β , BDNF et ROS, qui va en retour moduler l'activité de la synapse. Abréviations: ATP, adénosine triphosphate; ADP, adénosine diphosphate; iGluR, récepteur ionotrope du glutamate; mGluR, récepteur métabotrope du glutamate; TNF- α , facteur de nécrose tumorale α ; IL-1 β , interleukine-1 β ; IL-1R, récepteur de l'interleukine-1; BDNF, facteur neurotrophique dérivé du cerveau; TrkB, récepteur de la tropomyosine kinase B; ROS, espèces réactives de l'oxygène

Les cellules microgliales participent à l'homéostasie du SNC. Pour remplir cette fonction, elles possèdent une grande variété de récepteurs, canaux ioniques et transporteurs leur permettant d'être en permanence connectées avec le milieu environnant comme les neurones, les astrocytes ou les vaisseaux sanguins (Hickman et al., 2013; Zhang et al., 2014). Plus récemment, des études ont également montré que la microglie était en contact avec les synapses, aussi bien au niveau pré- que post-synaptique et donc capables de moduler la transmission des messages synaptiques (voir York et al., 2018 pour revue, Figure 10). Parmi les récepteurs présents à la surface des cellules microgliales, nous pouvons citer les récepteurs purinergiques (P₂R), activés par l'ATP, et exprimés très fortement par ces cellules en comparaison d'autres types cellulaires. On distingue 2 sous-classes de récepteurs purinergiques, les récepteurs P₂Y qui sont des récepteurs métabotropiques et les P₂X qui sont des récepteurs ionotropiques. Les récepteurs de type P₂X se lient spécifiquement à l'ATP, permettant l'ouverture de canaux sodiques, potassiques et/ou calciques.

➤ *Physiopathologie*

Les premières observations de réactivité microgliale en condition pathologique remontent aux années 70 (Adrian et al., 1978). Depuis, le rôle clé des cellules microgliales dans les mécanismes d'activation et de sensibilisation neuronale a été identifié et analysé dans le développement des douleurs neuropathiques (Beggs et al., 2012; Calvo and Bennett, 2012; Ji and Suter, 2007; Tsuda, 2016, 2016; Tsuda and Inoue, 2016) et inflammatoires (Hua et al., 2005; Taves et al., 2016; Xu et al., 2016).

Les cellules microgliales, une fois activées, passent par des états différents dits M1 ou M2 (Kabba et al., 2018). Le premier type M1, conduit à la production de médiateurs de l'inflammation comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS*) et des cytokines/chimiokines proinflammatoires, molécules potentiellement cytotoxiques pour les neurones et les autres cellules gliales environnantes (Kabba et al., 2018). M2, qui succède à M1, conduit à la production de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs de croissance pour stimuler la réparation tissulaire (Cherry et al., 2014). L'équilibre entre ces deux phénotypes de microglie est souvent altéré en contexte pathologique.

B. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules qui assurent la myélinisation des axones au sein du SNC. Un oligodendrocyte, grâce à ses prolongements cytoplasmiques qui s'enroulent plusieurs fois autour de l'axone, forme une gaine de myéline qui permet d'isoler l'axone. En effet, la composition biochimique membranaire, très lipidique, des oligodendrocytes empêche le passage des ions comme un isolant électrique. Ainsi, la conduction électrique se fait uniquement *via* les canaux présents au niveau des nœuds de Ranvier ce qui augmente la vitesse de propagation des signaux électriques (conduction saltatoire des potentiels d'action) le long d'un axone et donc dans un réseau.

Les oligodendrocytes sont également essentiels pour le fonctionnement et la survie de l'axone (Nave, 2010). En effet, les oligodendrocytes sécrètent des facteurs tels que l'« insulin-like growth factor » (IGF-1*), le « brain derived neurotrophic factor » (BDNF*) ou la neurotrophine 3 (NT-3*) qui augmentent la survie et l'activité neuronale (Wilkins et al., 2001; Dai et al., 2003). De plus, la conduction de l'influx nerveux le long des axones, sous forme de potentiels d'actions (PA*), consomme de l'ATP lié à l'activité de pompes comme la Na⁺/K⁺/ATPase. La régulation ionique et le réapprovisionnement en métabolites tels que le lactate sont donc essentiels pour le fonctionnement de l'axone (Nave, 2010). Les oligodendrocytes participent, avec également l'aide des astrocytes, à cet approvisionnement. En effet, les oligodendrocytes expriment des transporteurs au glucose de type 1 (GLUT1*) et des transporteurs aux monocarboxylates de type 1 et 2 (MCT1* et MCT2*), permettant le transport du glucose qui sera métabolisé en lactate puis redistribué au niveau de l'axone.

C. Les cellules gliales périphériques

➤ *Les cellules de Schwann*

Elles constituent l'équivalent fonctionnel des oligodendrocytes au niveau du système nerveux périphérique. Elles vont donc assurer la myélinisation des axones et dendrites des neurones situés à la périphérie. De plus, ces cellules sont capables de sécréter des facteurs neurotrophiques, comme le NGF (nerve growth factor), qui participent et permettent la repousse axonale en cas de lésion.

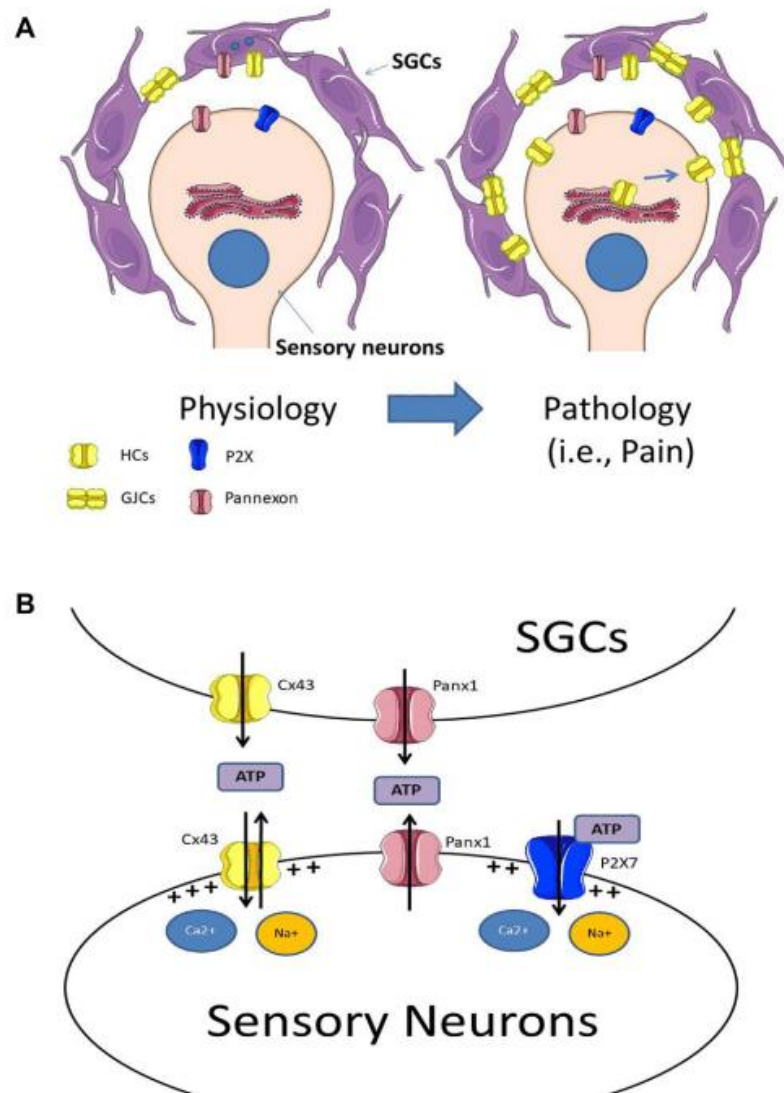


Figure 9 : Modèle de communication mixte « directe et paracrine » dans le système nerveux périphérique.

Ce modèle illustre la double communication mise en place dans le système nerveux périphérique entre les cellules gliales satellites et les neurones sensoriels ganglionnaires. Il montre qu'en condition physiologique, il existe un nombre restreint de jonctions communicantes (« GJCs») entre les cellules gliales satellites et d'hémi-canaux (« HCs » et « Pannexon ») ouverts sur le milieu extracellulaire, permettant des échanges paracrines (notamment d'ATP, via le récepteur P2X). Cependant, en condition pathologique, comme lors d'une migraine, ce nombre de jonctions communicantes et d'hémi-canaux augmente, pour permettre un taux d'échange et une mobilisation cellulaire plus importante.

➤ *Les cellules satellites*

Ce sont les astrocytes du système nerveux périphérique, retrouvées au niveau des ganglions spinaux et du ganglion de Gasser. Elles entourent les corps cellulaires des neurones ganglionnaires en formant une « gaine » autour de ceux-ci. Contrairement aux astrocytes du système nerveux central, les cellules satellites ne sont pas ou peu ramifiées, collées les unes aux autres sans avoir de territoire propre, comme c'est le cas au niveau des astrocytes centraux. En revanche, comme ces derniers, les cellules satellites (SGCs*) ont un rôle dans le métabolisme des neurones, ainsi que dans le maintien du micro-environnement neuronal en régulant les concentrations d'ions potassium, de glutamate, de neurotransmetteurs et de métabolites extracellulaires (Hanani, 2005; Scemes and Spray, 2012). Elles sont aussi capables d'exprimer la protéine des jonctions communicantes, la Connexine 43 (Cx43*). Les jonctions communicantes relient les cellules satellites entre elles en un vaste réseau facilitant la communication intercellulaire (Hanani, 2005). Ces connexines expriment des « hémi-canaux » permettant de libérer divers messagers dans l'environnement immédiat des neurones. (Retamal et al., 2017), qui, en se fixant sur leurs récepteurs neuronaux peuvent moduler l'activité de celui-ci. Certaines études ont montré des modifications d'expression de ces connexines en condition pathologique, comme après une lésion nerveuse, suggérant un rôle de ces cellules dans les mécanismes physiopathologiques (Cairns et al., 2015; Donegan et al., 2013; Fan et al., 2019; Retamal et al., 2017), Figure 11.

Les astrocytes centraux sont traités dans la partie suivante qui sera plus développée compte tenu de la problématique de la sensibilisation centrale et du rôle que ces cellules peuvent jouer, entre autres, dans la plasticité synaptique en condition physiologique et physiopathologique comme la migraine.

III. Les astrocytes

Les astrocytes représentent entre 40 et 60% du total des cellules gliales du SNC (Herculano-Houzel, 2014). Dans cette partie, nous ferons un bref rappel historique et présenterons les caractéristiques morfo-physiologiques ainsi que leurs principales fonctions neurobiologiques. Nous traiterons plus particulièrement de la communication neurone-astrocyte, avec notamment la synapse tripartite. Enfin nous terminerons sur le rôle des astrocytes dans la douleur.

A. Historique

Contrairement aux neurones électriquement excitables et capables de générer des potentiels d'actions, les astrocytes ne présentent pas la même concentration en canaux ioniques. Puisqu'elles semblaient « silencieuses », les astrocytes ont longtemps été considérés que comme des cellules nourricières pour les neurones. Il faudra attendre les travaux d'Ann Cornell-Bell et Steve Finkbeiner en 1990, pour qu'on découvre que les astrocytes sont dotés d'une excitabilité, reposant sur des variations intracellulaires de calcium (Cornell-Bell et al., 1990). Cette signalisation calcique astrocytaire est au centre de nombreuses fonctions que nous décrirons par la suite. Plus tard (Araque et al., 1999), a été proposé la conception de la synapse tripartite où, par opposition à la vision bipartite (incluant uniquement les éléments pré- et post-synaptiques), l'astrocyte devenait un élément fondamental et incontournable de la physiologie synaptique. Cette remise en question du modèle purement neuronal a permis d'ouvrir des opportunités de recherche aussi bien dans les mécanismes physiologiques, mais également dans la physiopathologie et les cibles thérapeutiques pour les maladies neurologiques. Depuis, l'essor des études portant sur l'implication des astrocytes n'a cessé de croître au cours des 20 dernières années.

B. Caractéristiques des astrocytes

➤ *Différents types*

Chez les mammifères, il existe une grande hétérogénéité des phénotypes astrocytaires et leur classification fait encore débat (Kimmelberg, 2004). Au niveau morphologique, les astrocytes se caractérisent par l'expression de la protéine de l'acide glial fibrillaire (GFAP*), une protéine de filament intermédiaire présente presque exclusivement dans ces cellules et responsable de leur architecture cytosquelettique et de leur résistance mécanique (Yang and Wang, 2015). Même si des études immunohistochimiques rapportent que 40% des astrocytes n'expriment pas cette protéine, ce pourcentage varie en fonction des structures cérébrales (Walz and Lang, 1998). De plus, la GFAP n'est pas exprimée au niveau des prolongements distaux des astrocytes, soit environ 15% du volume total d'un astrocyte. D'autres marqueurs d'astrocytes peuvent également être utilisés comme la protéine S100 β ou le transporteur du glutamate GLT1*. Cependant la protéine GFAP reste le marqueur astrocytaire le plus largement utilisé.

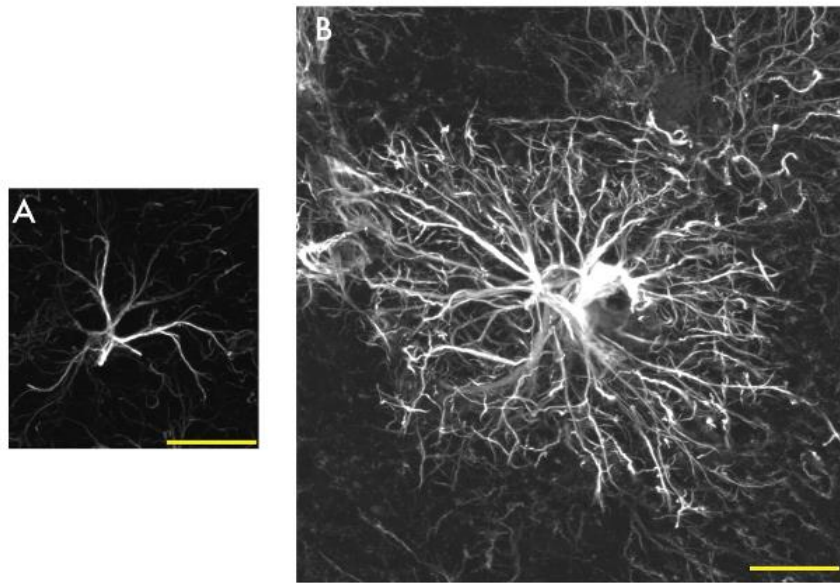


Figure 11 : Comparaison de la taille et complexité des astrocytes d'un rongeur et d'un humain : (A) Astrocyte protoplasmique d'une souris marquée avec GFAP (B) Le même type chez l'homme, avec la même échelle. (D'après Oberheim et al. ; 2009)

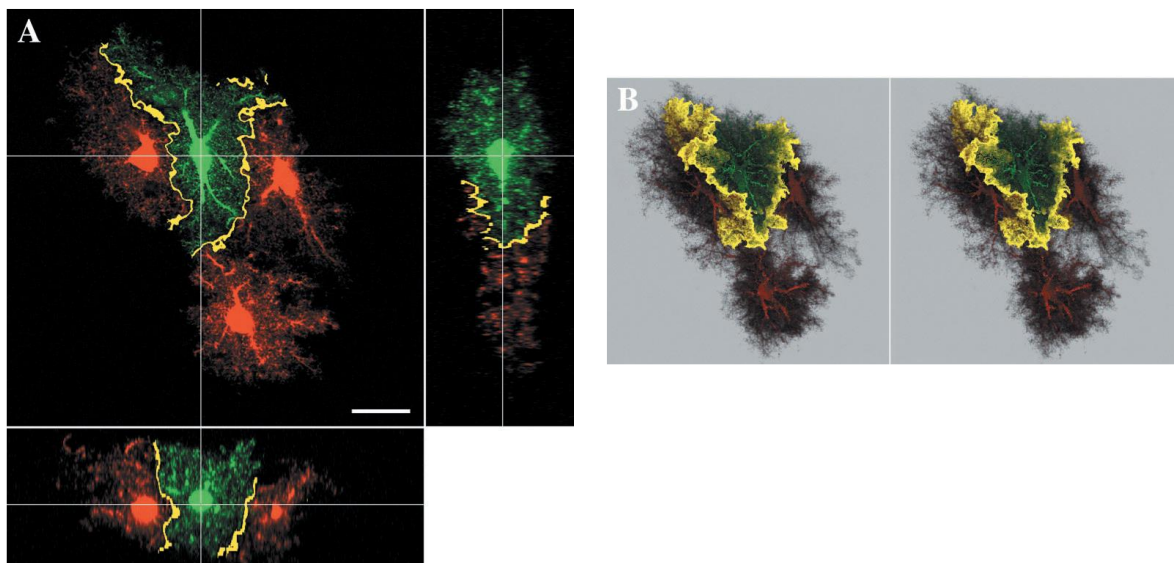


Figure 103 : Les domaines des astrocytes (Bushong et al.,2002).
 (A) Les astrocytes ont été remplis avec des marqueurs fluorescents des différentes couleurs (Alexa488 et Alexa564). La zone en jaune correspond à la colocalisation entre les 2 couleurs, ce qui signifie qu'il y a recouvrement des prolongements des astrocytes. (B) Modélisation 3D des images obtenues à gauche. Cette reconstruction 3D permet de visualiser le domaine propre à l'astrocyte vert au centre, et la zone de chevauchement à la périphérie de celui-ci en jaune.

Ce marquage permet de visualiser et de différencier la morphologie des différents astrocytes présents dans le SNC. Deux types principaux d'astrocytes ont été mis en évidence grâce à leurs caractéristiques morphologiques et à leur localisation.

Un type dit « protoplasmique », présent dans la substance grise du SNC, se caractérise par un corps cellulaire de petite taille et une morphologie très complexe avec de nombreux prolongements qui font contact à la fois avec les synapses et les vaisseaux sanguins (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007). Ils participent aussi à la « glie limitans » au niveau de la surface de la pie mère. Ces astrocytes possèdent aussi des zones de contact entre eux (cf paragraphe sur le domaine des astrocytes).

Un second type dit « astrocyte fibreux », présent dans la substance blanche, se caractérise par des prolongements de très grande taille (jusque 100µm) orientés dans le même sens que les axones (Lundgaard et al., 2014). Les prolongements des astrocytes fibreux sont moins nombreux que pour le type protoplasmique mais ils peuvent également contacter les vaisseaux et participent ainsi à la barrière hémato-encéphalique. D'autres prolongements dits péri-nodaux contactent les axones des neurones myélinisés au niveau des nœuds de Ranvier.

Outre ces 2 types d'astrocytes largement majoritaires, existent aussi des sous-types d'astrocytes particuliers comme ceux retrouvés au niveau de la rétine de la glie radiaire, appelés « cellule de Müller » (Ramírez et al., 1996). La glie radiaire est impliquée dans le développement du cerveau et notamment dans la migration neuronale. Cette glie radiaire va ensuite se diviser et se différencier pour donner des oligodendrocytes et des astrocytes, en dehors de la rétine où elle subsiste sous la forme de cellule pluripotente. On retrouve un autre type d'astrocytes au niveau du cervelet : les cellules de Bergmann, qui sont localisées au niveau de l'arbre dendritique des cellules de Purkinje (Yamada and Watanabe, 2002). Il existe aussi des astrocytes inter-laminaires corticaux, situés dans la couche 1 du cortex, et les astrocytes à projection variqueuse, situés principalement dans les couches 5–6.(Tabata, 2015). Il est à noter cependant que ces astrocytes à projection variqueuse sont retrouvés dans le cerveau humain mais pas chez le rat ou la souris (Oberheim et al., 2009)

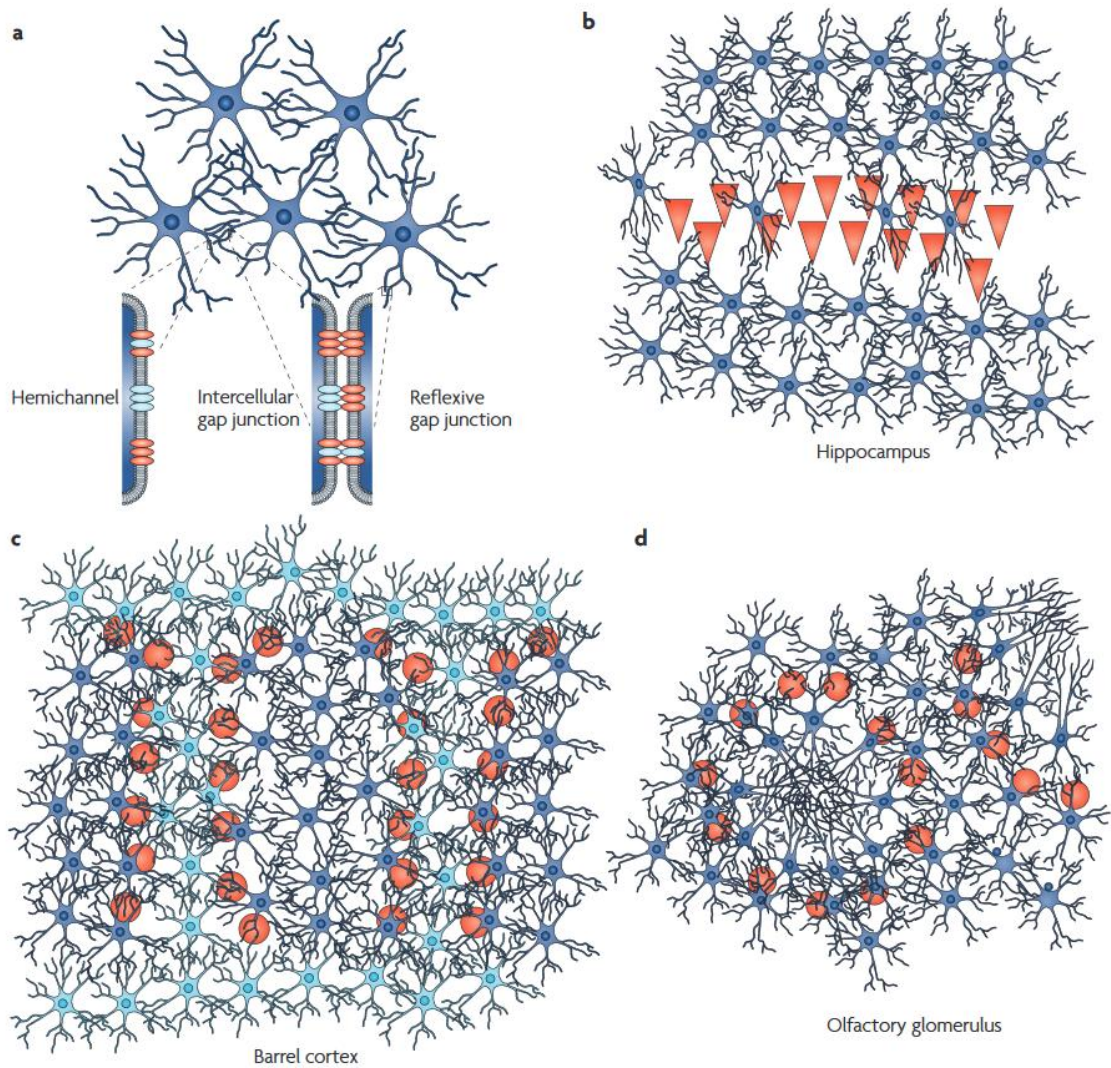


Figure 12 : Organisation du réseau astrocytaire (d'après Giaume et al. ; 2010)

(a) Localisation et structure des connexine (Cx) dans les astrocytes. Dans un astrocyte individuel, un prolongement peut entrer en contact avec un autre et former des jonctions avec celui-ci. Alternativement, les Cx peuvent également fonctionner comme des héli-canaux à la surface de la membrane cellulaire pour échanger des informations avec l'espace extracellulaire. Comme les astrocytes expriment principalement deux Cx, plusieurs combinaisons de Cx43 (bleu) et de Cx30 (rouge) peuvent être rencontrées. **(b)** à **(d)** Exemples d'organisation de différents réseaux astrogliaux. **(b)** Dans l'hippocampe, la couche de neurones pyramidaux (en rouge) limite le nombre d'astrocytes dans ce compartiment et affecte leur morphologie **(c)** Dans le cortex somatosensoriel, la distribution des astrocytes est homogène, mais Cx30 et Cx43 sont exprimées de manière différentielle dans des tonneaux et des septa: elles sont fortement exprimées dans des astrocytes de tonneau (bleu foncé) et faiblement exprimées dans des astrocytes septaux (bleu clair) **(d)** Dans le bulbe olfactif, les corps cellulaires des astrocytes glomérulaires sont situés à la périphérie alors que leurs processus ont une orientation centripète. En **(c)** et **(d)** la communication est centrée sur le centre de l'unité fonctionnelle, ce qui améliore la communication dans les compartiments neuronaux. Les triangles ou cercles rouges indiquent l'emplacement du soma neuronal dans les structures indiquées, mais ne reflètent pas leur densité ou leur taille.

➤ *Domaine des astrocytes*

L'astrocyte protoplasmique est le type d'astrocyte le plus étudié car il présente des contacts à la fois avec les vaisseaux sanguins et les neurones. Il a été montré qu'un seul astrocyte, dans le cortex de rongeurs, pouvait contacter jusqu'à 140 000 synapses, entre 4 et 6 somas de neurones et entre 300 et 600 dendrites (Halassa et al., 2007). Cette arborisation très riche des astrocytes est de plus limitée à un territoire qui lui est propre, avec très peu de recouvrement des domaines astrocytaires entre eux (environ 5% seulement) (Bushong et al., 2002, Figure 13). La connectivité importante des astrocytes corticaux des rongeurs donne un aperçu de la complexité et de l'importance de ces cellules dans la régulation et le contrôle du fonctionnement des neurones. Cette complexité et connectivité est encore plus importante chez l'homme : les astrocytes sont 3 à 6 fois plus larges, présentent environ 10 fois plus de branches et peuvent ainsi contacter jusqu'à 2 millions de synapses (Oberheim et al., 2009).

Les différences de morphologie et de connectivité observées entre les astrocytes murins et humains ont permis d'avancer l'hypothèse que ces cellules pourraient participer au développement et à la performance des fonctions nerveuses, notamment cognitives. Pour tester cette hypothèse, une étude a été réalisée par l'équipe de Goldman et Nedergaard en 2013 qui a créé des souris chimères à partir de progéniteurs d'astrocytes humains (plus gros et plus connectés) injectés dans l'hippocampe. Les résultats ont montré que les astrocytes humains ont pu se développer, coloniser et établir des contacts avec les neurones murins dans l'hippocampe des souris. Mais surtout, les souris chimères présentaient une facilitation de l'induction de LTP et des performances cognitives améliorées par rapport aux animaux témoins (Han et al., 2013).

➤ *Réseau astrocytaire*

Nous savons que les astrocytes ont chacun leur propre domaine qui ne présente que très peu de recouvrement avec le réseau des astrocytes voisins. Cependant, les astrocytes sont reliés entre eux avec un couplage, comme le montre l'injection de jaune Lucifer, dans un astrocyte (Gutnick et al., 1981). Ce travail a permis de révéler un marquage se diffusant à d'autres cellules voisines présentant une morphologie caractéristique d'astrocyte. Le support physiologique de ce couplage est lié à des jonctions communicantes entre astrocytes. Ces jonctions sont assurées par des protéines transmembranaires appelées connexines. Elles peuvent s'assembler en hétéro ou homo-hexamère, pour former un « héli-canal » appelé

connexon. Deux connexons peuvent ensuite s'associer pour former une jonction communicante. Les jonctions communicantes permettent un passage direct d'ions et de petites molécules de cellule à cellule (entre 1 et 1,2 kDa). Ce mécanisme permet par exemple de redistribuer le potassium suite à sa recapture (Scemes and Spray, 2012) ou le passage de molécules de signalisation comme l'ATP, l'IP3 ou le glutamate (Harris, 2007) .

Les connexines peuvent aussi s'assembler et former des « héli-canaux » directement ouverts sur le milieu extracellulaire qui permettent de libérer les ions et les molécules au niveau extracellulaire directement, permettant une communication autocrine ou paracrine (Bennett et al., 2003). Les connexines exprimées par les astrocytes sont la Connexine 30 et la Connexine 43 (Söhl et al., 2004)

Depuis la découverte du couplage des astrocytes entre eux *via* les jonctions communicantes, le terme de syncytium a été utilisé pour décrire ce réseau. Cependant récemment ce terme a été revu, puisque tous les astrocytes ne sont pas reliés entre eux de manière uniforme, mais d'un système régulé de manière plus complexe (Figure 14, Giaume et al., 2010). Par exemple, au niveau du cortex , les astrocytes appartenant à un même barrel (ou tonneau) cortical vont être connectés entre eux (Houades et al., 2008) alors que ceux se trouvant au niveau du septum ne seront que peu connectés aux astrocytes environnants (Houades et al., 2008). L'étendue de ce couplage varie en fonction de la structure mais aussi au cours du développement et en fonction de l'état physiologique (pour revue voir Giaume et al., 2010).

➤ *Mode de communication des astrocytes : les vagues calciques*

Ann Cornell-Bell et Steve Finkbeiner en 1990 montrent, sur une préparation d'astrocytes hippocampiques en culture, des augmentations intracellulaires de calcium lors de stimulations des astrocytes par le glutamate. Cette augmentation en Ca^{2+} entraîne également une augmentation calcique dans les neurones adjacents, d'où l'émergence du concept de « gliotransmission » (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994). Ces « vagues calciques » sont révélées par imagerie *via* l'utilisation de senseurs sensibles au calcium tel que GCaMP2. Les vagues calciques des astrocytes se propagent de cellules en cellules *via* le couplage décrit précédemment (connexines).

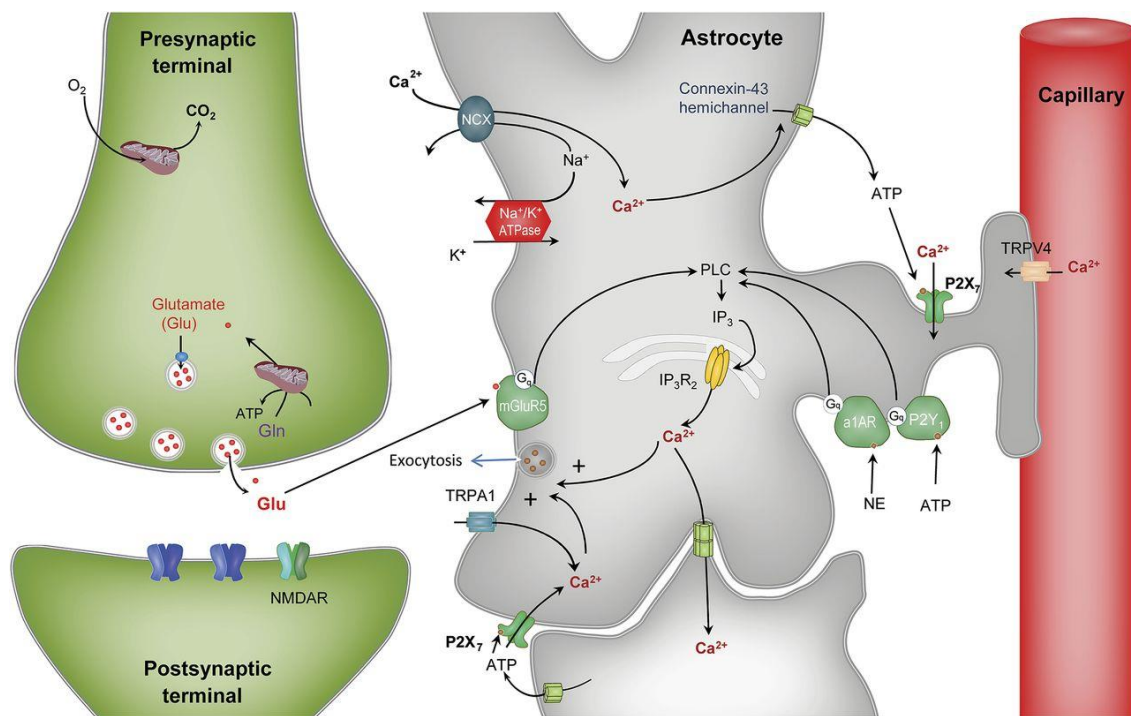


Figure 13 : Induction et propagation des vagues calciques astrocytaire (D'après Benarroch 2016)

Il existe une compartimentation de la signalisation du Ca^{2+} dans les astrocytes. Au niveau des prolongements, les signaux spontanés de Ca^{2+} se produisent au niveau des microdomaines membranaires. Ces vagues sont induites par les canaux de potentiel transitoire (TRP), tels que les canaux TRP ankyrine de type 1 (TRPA1) dans les processus péri-synaptiques et les canaux de TRP récepteur de vanilloïde type 4 (TRPV4) aux pieds astrocytaires, ainsi que les récepteurs purinergiques P2X7 activés par l'adénosine triphosphate (ATP). Un influx de Ca^{2+} se produit également via l'échangeur de sodium $\text{Na}^{+} / \text{Ca}^{2+}$ (NCX). Au niveau du soma, la libération de Ca^{2+} se fait à partir des réserves intracellulaires du réticulum endoplasmique, via des canaux de type inositol triphosphate (IP3) de type 2 (IP3R2), en réponse à l'activation de la phospholipase C (PLC). La PLC est activé par le récepteur métabotrope du glutamate (mGluR) 5, le purinergique P2Y1, les récepteurs $\alpha 1$ adrénergiques ($\alpha 1\text{AR}$) activés par la noradrénaline (NE)

Cette augmentation du calcium intracellulaire permet la libération de gliotransmetteurs tels que du glutamate (Araque et al., 1998; Pasti et al., 1997) l'ATP (Kang et al., 1998; Newman, 2003), la D-serine (co-agoniste des récepteurs NMDA (Mothet et al., 2000; Panatier et al., 2006; Yang et al., 2003)) ou le GABA (Chai et al., 2014a; Liu et al., 2000). C'est *via* la libération de ces gliotransmetteurs que les astrocytes vont réguler l'activité synaptique des neurones.

En fonction de la localisation des vagues calciques, soit au niveau du soma, soit au niveau des prolongements astrocytaires, le mécanisme et la dynamique de ces variations calciques va être différent (voir pour revue Bazargani and Attwell, 2016).

Au niveau du soma, les variations de Ca^{2+} intracellulaires sont liées à l'activation de récepteurs tels que le récepteur métabotrope du glutamate mGluR5 ou le récepteur purinergique P2Y1 (Figure 15). L'activation de ces 2 récepteurs entraîne une activation de la phospholipase C qui active l'Inositol Phosphate 3 (IP3*). Ce dernier active la pompe du réticulum endoplasmique (IP3 récepteur) et libère le stock de calcium intracellulaire, entraînant une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (Bazargani and Attwell, 2016; Boitano et al., 1992).

Grâce à l'amélioration de la résolution de l'imagerie calcique, il a été montré que les prolongements astrocytaires et plus précisément ceux en contact avec les synapses émettaient des vagues calciques de manière beaucoup plus dynamique (plus fréquentes et plus rapides) qu'au niveau des somas (Bindocci et al., 2017). L'origine du calcium est également différente. Sachant que les stocks intracellulaires ne représentent qu'environ 60% des variations de calcium intracellulaire, les 40% restant dépendants de l'entrée de calcium extracellulaire (Srinivasan et al., 2015). Des récepteurs comme les canaux AMPA, NMDA, les récepteurs purinergiques P2X (Hamilton et al., 2008) ou le récepteur TRPA1 (Shigetomi et al., 2011) perméables au calcium participent à ces vagues calciques spécifiques des prolongements astrocytaires. L'étude de la dynamique et des mécanismes de régulation de ces vagues calciques est primordiale afin de comprendre comment les astrocytes modulent les synapses qu'ils contactent.

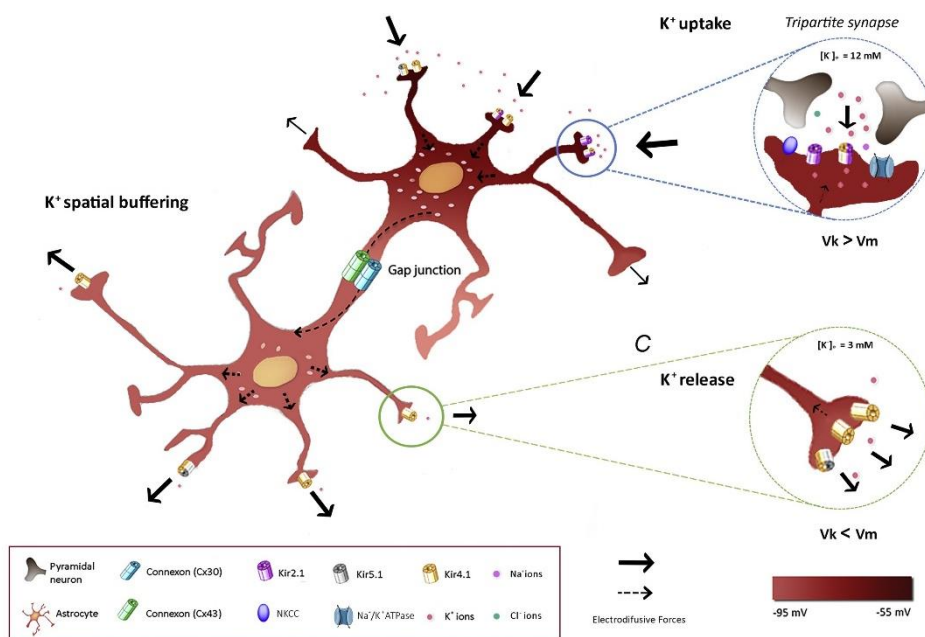


Figure 14 : Régulation de la concentration en [K⁺]_e par les astrocytes. D'après Bellot-Sac et al., 2017

L'activité neuronale entraîne une augmentation du [K⁺]_e qui va activer la pompe Na⁺/K⁺ ATPase, les canaux Kir et le Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co-transporteur (NKCC). Le potassium capté localement par un astrocyte va être redistribué via les Jonctions communicantes et va être libéré dans les zones où la concentration en [K⁺]_e est plus faible via les canaux Kir.

C. Fonctions physiologiques des astrocytes

➤ *Barrière hémato encéphalique (BHE*)*

Cette fonction essentielle des astrocytes a été décrite dès le début de la découverte des cellules gliales. En effet, les astrocytes présentent des extrémités spécialisées appelées podocytes qui viennent en contact avec les artérioles et les capillaires sanguins. La BHE a un rôle de protection du parenchyme cérébral contre l'entrée de composants potentiellement toxiques ou dangereux (médicaments, pathogènes, cellules immunes...) et de régulation au contraire de l'entrée d'éléments essentiels comme le glucose.

La BHE agit comme une «barrière physique» car les jonctions étroites complexes entre les cellules endothéliales adjacentes forcent les molécules circulant dans le flux moléculaire à emprunter une voie trans-cellulaire, plutôt que de se déplacer à travers les jonctions, comme dans la plupart des endothéliums.

Le rôle de l'astrocyte au niveau de la barrière hémato-encéphalique reste débattu mais de nombreuses études ont montré que l'astrocyte participe à l'établissement de cette barrière et à sa régulation (Abbott et al., 2006). Il a notamment été montré que la libération de certains facteurs tels que le facteur de croissance transformant beta (TGF- β), le facteur de croissance fibroblastique (FGF-2), le facteur de croissance neurotrophique dérivant des cellules gliales (GDNF) participent à l'intégrité de la barrière (Lee et al., 2003).

➤ *Homéostasie ionique (K⁺) et hydrique*

La concentration extracellulaire du potassium (K⁺) est à la base du fonctionnement des neurones et les variations de cette concentration ont un impact direct sur l'excitabilité neuronale. Lors de l'activation synaptique, nous assistons à une augmentation locale de la concentration en [K⁺]_e. A ce niveau, les astrocytes participent à l'homéostasie car ils interviennent dans la redistribution de ce potassium par un mécanisme appelé « spatial buffering ». Ainsi, dans un premier temps, les pompes Na⁺/K⁺/ATPase sont activées par l'augmentation de [K⁺]_e et de sodium intracellulaire [Na⁺]_i et permettent de récupérer l'excès de K⁺ extracellulaire (Larsen et al., 2016). Les canaux Kir (pour «inward rectifier potassium channel») et plus particulièrement les canaux Kir4.1 et 5.1 ainsi que les pompes NKCC (pour Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co-transporteur) sont également impliqués dans l'entrée de K⁺ dans les astrocytes (Bellot-Saez et al., 2017). Le K⁺ est ensuite redistribué dans le réseau astrocytaire via les

jonctions communicantes décrites précédemment, et libéré dans le compartiment extracellulaire à proximité des vaisseaux sanguins (Seifert et al., 2018) (Figure 16).

Les astrocytes expriment également des aquaporines (AQP*), notamment AQP4, nécessaires à la régulation bidirectionnelle du transport de l'eau à travers les membranes plasmiques (Verkman, 2011). La co-localisation de AQP4 et de Kir4.1 au niveau des pieds astrocytaires suggère que l'eau et le flux de K⁺ dans ces cellules pourraient être couplés fonctionnellement (Amiry-Moghaddam et al., 2003; Nagelhus et al., 2004).

➤ *Support métabolique pour les neurones*

Le fonctionnement des neurones demande beaucoup d'énergie, c'est pourquoi le cerveau est l'organe le plus « énergivore ». Ainsi même s'il ne représente que 2% de la masse corporelle, il représente près de 20% de la consommation en glucose et oxygène du corps humain. La très riche vascularisation du cerveau va permettre de fournir ces nutriments en grande quantité. Le glucose traverse la barrière hémato-encéphalique par le biais de transporteurs du glucose exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Une fois dans l'espace extracellulaire, les astrocytes, dont les podocytes entourent les vaisseaux sanguins, captent le glucose via les transporteurs GLUT. Les astrocytes transforment ensuite ce glucose en lactate, mais sont aussi capables de le stocker sous forme de glycogène. Ce sont les seules cellules disposant de cette capacité dans le SNC, servant ainsi de « support métabolique » en cas de forte demande énergétique locale. Le lactate est libéré par les astrocytes via le Monocarboxylique Transporter 1 (MCT1*) puis capté par les neurones où il entrera dans le cycle tricarboxylique afin de créer de l'ATP (Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Il est à noter également que le glucose peut aussi être capté directement par les neurones en contact avec les vaisseaux sanguins, puisque le transporteur GLUT est aussi exprimé par les neurones.

Les astrocytes sont également présents au niveau des nœuds de Ranvier où ils vont participer, avec les oligodendrocytes, au support métabolique de l'activité des axones c'est-à-dire la conduction des potentiels d'action. Les astrocytes sont d'ailleurs couplés aux oligodendrocytes via des jonctions communicantes pour assurer cette fonction (Nave, 2010).

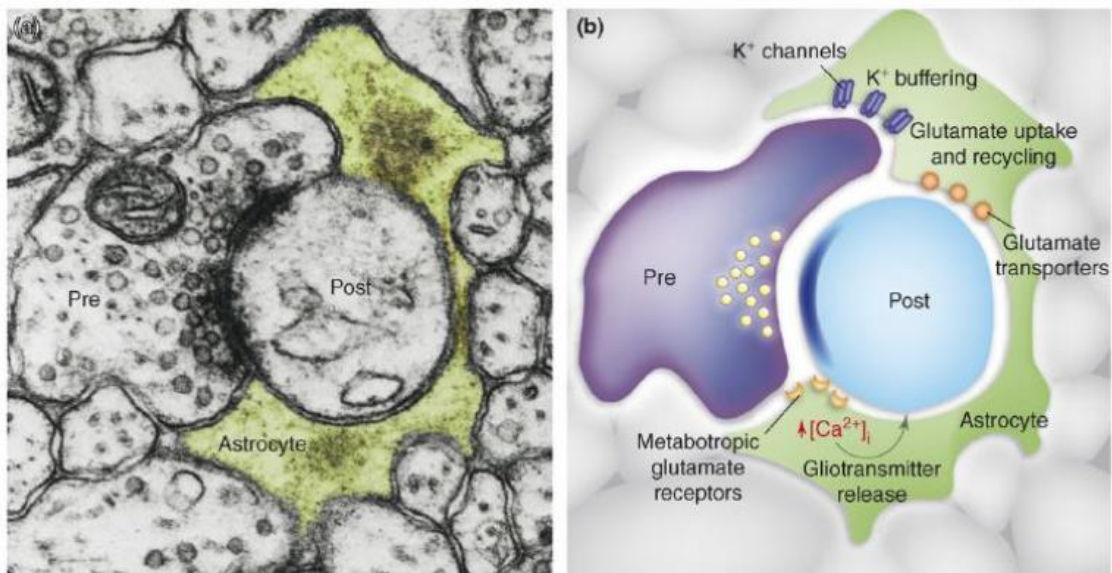


Figure 15 : La synapse tripartite. D'après Halassa et al., 2007

(a) Photographie de microscopie électronique représentant des terminaisons pré-et post-synaptiques entourées par un processus astrocytaire (en vert), formant la synapse tripartite. (b) Représentation schématique montrant l'étroite interaction anatomique et fonctionnelle entre les terminaisons neuronales et le processus astrocytaires.

IV. Interactions neurones/astrocytes

A. Recouvrements anatomiques de la synapse

Nous savons que les astrocytes sont capables d'influencer la neurotransmission entre neurones *via* notamment leurs prolongements cytoplasmiques qui recouvrent complètement les synapses (Figure 17). Ce couplage entre astrocyte et neurone est indispensable à l'homéostasie synaptique (Araque et al., 1999).

Le recouvrement des synapses par les astrocytes est aussi un phénomène dynamique. En effet, les synapses les plus actives sont préférentiellement contactées et enrobées par les prolongements astrocytaires (Hirrlinger et al., 2004). Le remaniement du recouvrement astrocytaire est un phénomène rapide. Les travaux, au niveau de l'hippocampe, réalisés par Haber et al., en 2006, montrent que les extensions ou au contraire la rétraction de prolongements astrocytaires peut se produire à l'échelle de quelques minutes. Ces remodelages sont liés à la dynamique des épines dendritiques, ce qui montre une corrélation importante entre l'activité synaptique et le recouvrement synaptique des astrocytes (Haber et al., 2006). Le recouvrement des synapses par les astrocytes permet une proximité spatiale et ainsi des échanges de neurotransmetteurs, gliotransmetteurs et de régulations ioniques (cf précéd). Ce recouvrement isole également la synapse et évite la diffusion de neurotransmetteurs vers d'autres synapses (Verkhratsky and Nedergaard, 2014).

B. Recapture des neurotransmetteurs

➤ *Cycle Glutamate/glutamine*

Les astrocytes jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement synaptique *via* la recapture et le recyclage du glutamate *via* un mécanisme appelé le cycle glutamate/glutamine. Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du SNC grâce à la mise en jeu de nombreux récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA, Kainate) et métabotropiques (mGlu). Pour un fonctionnement optimum de la transmission synaptique glutamatergique, la dynamique du glutamate dans la synapse doit être étroitement contrôlée. En effet, le glutamate en trop forte concentration synaptique entraîne des effets excitotoxiques (Gupta et al., 2013). La régulation du glutamate est donc réalisée par la recapture astrocytaire qui s'effectue *via* 2 transporteurs exprimés spécifiquement par les astrocytes :

GLAST* (ou EAAT1* pour Excitatory Amino Acide Transporter 4) et GLT1* (ou EAAT2* pour Excitatory Amino Acide Transporter 2)(Danbolt, 2001). La recapture astrocytaire est un mécanisme essentiel car le blocage de l'expression de ces transporteurs chez le rat provoque des effets neurotoxiques liés à une élévation du taux de glutamate synaptique (Rao et al., 2001; Rothstein et al., 1996; Tanaka et al., 1997).

De plus, les astrocytes fournissent les neurones en glutamine qui est le précurseur du glutamate (et du GABA). La glutamine est synthétisée à partir de glutamate via une enzyme, la Glutamine Synthétase (GS*) exprimée spécifiquement par les astrocytes (Rose et al., 2013). Le déséquilibre de ce recyclage du glutamate par l'inhibition de la GS participe aux phénomènes de sensibilisation centrale (Chiang et al., 2007).

Les astrocytes ont donc un double rôle de clairance de la fente synaptique et de recyclage du glutamate afin de restaurer les stocks pré-synaptiques sous forme de glutamine.

➤ *Autres neurotransmetteurs*

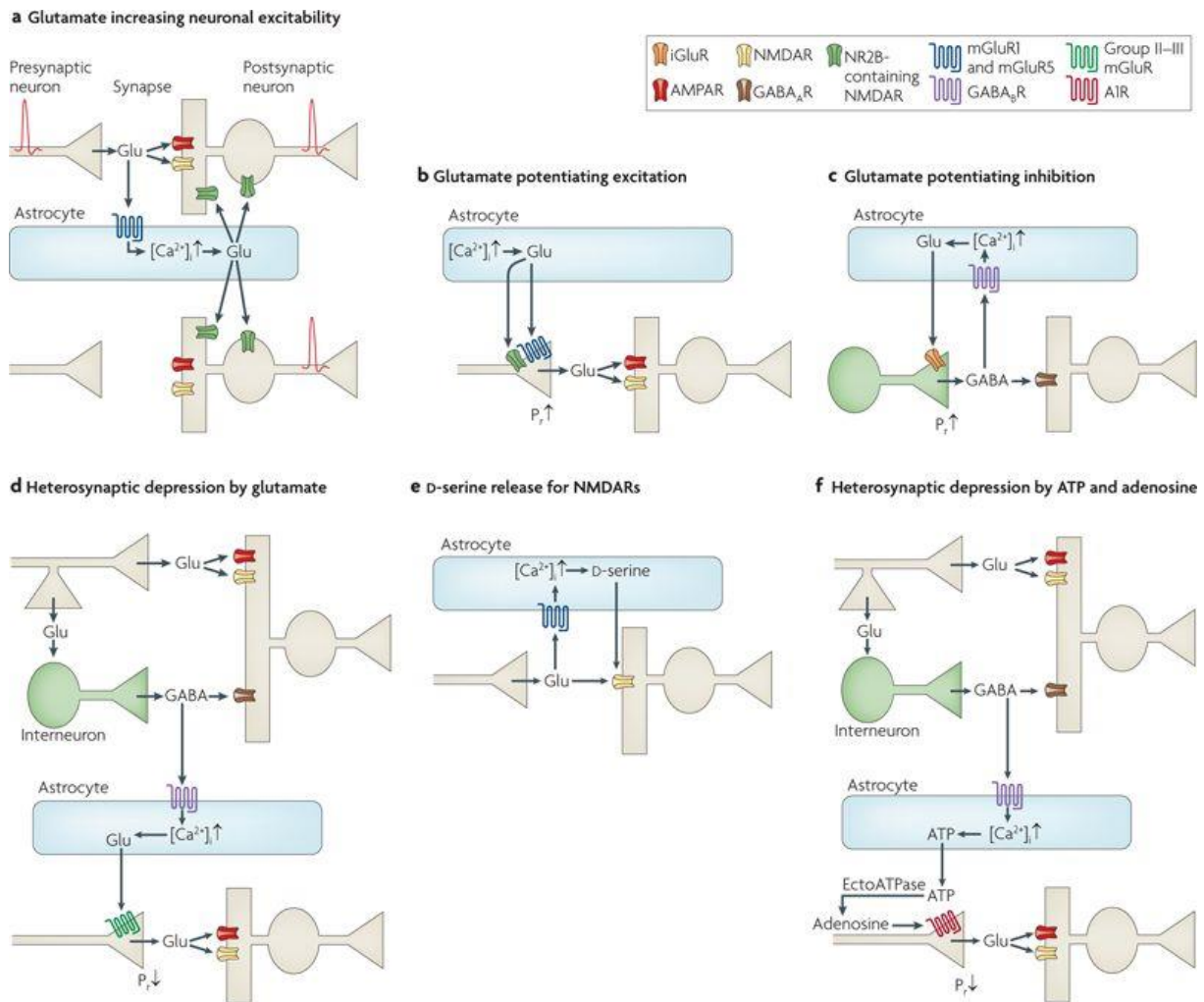
La recapture astrocytaire intervient dans la régulation du taux synaptique d'autres neurotransmetteurs comme par exemple l'acétylcholine ou les mono-amines. De plus, les systèmes inhibiteurs sont également soumis à une régulation astrocytaire. En effet, les astrocytes participent à la recapture du GABA *via* le transporteur GAT-3 (Xin and Bonci, 2018) afin de réduire la concentration en GABA lors d'une activité synaptique importante comme par exemple au niveau de l'hippocampe (Kersanté et al., 2013). De même, l'activité synaptique de la Glycine est modulée *via* le transporteur astrocytaire GLYT1 (López-Corcuera et al., 2017).

C. Libération des gliotransmetteurs

En plus de leur participation dans la recapture des neurotransmetteurs, les astrocytes peuvent aussi libérer des molécules agissant au niveau synaptique. Ces substances ont été nommées « gliotransmetteurs » par analogie avec les « neurotransmetteurs ».

➤ *Glutamate*

En plus du rôle joué par les astrocytes dans la recapture et le recyclage du glutamate, ils sont capables de libérer du glutamate de manière active. Cette libération va pouvoir renforcer localement l'action du glutamate en augmentant significativement sa concentration au sein de la synapse. Ce relargage, par les astrocytes est principalement vésiculaire, grâce au complexe SNARE* (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 16 : Modulation de la transmission synaptique par la gliotransmission. D'après Hamilton & Attwell, 2010.

Modulation de l'excitabilité par une action au niveau post-synaptique (a), modulation homosynaptique de la libération par action pré-synaptique d'une synapse excitatrice(b) ou inhibitrice (c). Modulation hétérosynaptique (d, f). La libération de D-sérine par l'astrocyte permet d'activer les récepteurs NMDA (e). Dépression hétérosynaptique : activé par le GABA, l'astrocyte libère de l'ATP qui, transformé en adénosine, diminue la transmission glutamatergique de manière hétérosynaptique (f).

(Schwarz et al., 2017) . Le transporteur VGLUT1 a été identifié comme le transporteur permettant de concentrer le glutamate au sein des vésicules avant leur libération (Malarkey and Parpura, 2008; Ropert et al., 2016; Schwarz et al., 2017). Au niveau des synapses glutamatergiques (de l'hippocampe), la libération de glutamate par les astrocytes active les récepteurs NMDA en post-synaptiques et les récepteurs métabotropiques mGluR1 en pré-synaptiques (Figure 18 a,b) et augmente ainsi l'excitabilité neuronale et la libération de glutamate.

Cette mise en jeu des récepteurs au glutamate se traduit par une augmentation de la fréquence des courants excitateurs post-synaptiques spontanés (sEPSC*) et évoqués (eEPSC*) (Fiacco and McCarthy, 2004; Perea and Araque, 2007). La libération de glutamate par les astrocytes peut également renforcer l'effet inhibiteur des interneurons GABAergiques (Figure 18 c) *via* la mise en jeu des récepteurs AMPA et NMDA situés au niveau pré-synaptique des synapses GABAergiques de l'hippocampe (Kang et al, 1998). Le glutamate libéré via les astrocytes peut aussi avoir un effet extra-synaptique, via l'activation, au niveau d'autres synapses ; de récepteurs métabotropiques mGlu1 pré-synaptiques (Papouin et al., 2012) (Figure 18 a,b).

➤ ATP

En 1999, l'équipe de Guthrie montre que les astrocytes sont capables de libérer de l'ATP via un mécanisme Ca^{2+} dépendant (Guthrie et al., 1999) et d'activer les récepteurs purinergiques neuronaux mais également microgliaux.

Des études récentes ont montré le rôle de l'ATP astrocytaire dans la régulation synaptique, et plus particulièrement de l'adénosine qui est issue de la dégradation de l'ATP par des ectoATPases dans l'espace extracellulaire (Zimmermann and Braun, 1996). En effet (cf Figure 18 f), l'adénosine en activant les récepteurs A1 pré-synaptiques (récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G_i) est capable de réguler l'activité synaptique en diminuant la libération de glutamate (Panatier et al., 2011; Pascual et al., 2005; Tan et al., 2017). Enfin, l'ATP astrocytaire peut également activer les neurones, notamment cortico-pyramidaux, et ce *via* le récepteur P2Y1 (Tan et al., 2017).

➤ D-sérine

La D-sérine est un co-agoniste du récepteur NMDA, qui se fixe à la sous-unité NR1, au niveau du site de liaison de la glycine. L'activation des récepteurs NMDA nécessite la liaison du glutamate, mais également celle d'un co-agoniste tel que la glycine ou la D-sérine (Gustafson et al., 2007). La D-sérine est un gliotransmetteur synthétisé à partir de L-sérine *via* la sérine racémase. Elle est considérée comme un « gliotransmetteur » depuis les travaux de Schell, Molliver et Snyder en 1995. Dans certaines régions cérébrales, il semble que la D-sérine soit le co-agoniste principal des récepteurs NMDA. Cela a été démontré notamment dans l'hippocampe, où la D-sérine est essentielle dans les mécanismes d'induction de la LTP. Le blocage de l'activité des astrocytes, de leur capacité de libération ce gliotransmetteur ou directement le blocage de la D-sérine inhibe l'induction de LTP (Henneberger et al., 2010; Panatier et al., 2006; Yang et al., 2003).

Le mécanisme de libération de la D-sérine est Ca²⁺/SNARE dépendant, tout comme le glutamate (Martineau et al., 2013; Mothet et al., 2005). De manière intéressante, des vésicules contenant à la fois le glutamate et la D-sérine ont été identifiés dans les fins prolongements astrocytaires, suggérant une co-libération. Ainsi la D-sérine renforcerait l'action du glutamate sur les récepteurs NMDA (Martineau et al., 2013).

Les taux synaptiques de D-sérine sont régulés par la recapture *via* deux transporteurs : les transporteurs alanine-sérine-cystéine dépendants de Na⁺ 1 et 2 (ASCT1* et ASCT2*) (Martineau et al. 2014).

L'origine astrocytaire de la D-sérine en condition physiologique fait actuellement débat (Papouin et al., 2017 vs Wolosker et al., 2016, 2017). En effet, des données récentes ont été obtenues à partir de lignées génétiquement modifiées, avec un Knock Out conditionnel sur le gène codant pour la Sérine racémase sous le contrôle de promoteurs spécifiques des astrocytes ou des neurones. Les résultats de ces études montrent que le KO conditionnel sous le contrôle d'un promoteur spécifique des astrocytes n'a peu ou pas d'incidence sur l'induction de la LTP dans l'hippocampe, alors que le KO de la sérine racémase dans les neurones empêche son induction (Perez et al., 2017). Les lignées génétiquement modifiées ont également servi de contrôle négatif de différents anticorps ciblant soit la D-sérine directement, soit la sérine racémase. Les résultats obtenus avec des anticorps validés dans ces lignées ont permis de montrer une localisation préférentielle de la sérine racémase dans les

Group function	Example	Specific function
Ion and volume homeostasis	Sodium (Na ⁺)/potassium (K ⁺) ATPase	Maintains transmembrane Na ⁺ gradient required to drive other transporters
		K ⁺ homeostasis
		Activation of glycolysis
	Na ⁺ -K ⁺ -chloride (Cl ⁻) cotransporter 1	K ⁺ homeostasis
		Maintenance of cell volume
	Na ⁺ /calcium (Ca ²⁺) exchanger	Bidirectional regulation of Na ⁺ and Ca ²⁺ influx or efflux
	Na ⁺ -bicarbonate cotransporter	Contributes to resting intercellular Na ⁺ levels, regulation of pH and volume
	Na ⁺ /proton (H ⁺) exchanger	Pumps H ⁺ into cells
		Drives lactate efflux
	Connexin 30 and 43 hemichannels	Gap junction formation
		Glutamate release (hemichannels)
	Inward rectifier K ⁺ channel 4.1	K ⁺ homeostasis
		Volume regulation
Aquaporin 4	Water channel involved in volume regulation	
Volume-regulated anion channel	Cl ⁻ , bicarbonate, and organic anion channel involved in volume regulation	
Energy substrate delivery	Glucose transporter 1	Uptake of glucose from the bloodstream
	Monocarboxylic transporter 1	Lactate shuttle from the astrocyte to neurons
Neurotransmitter homeostasis	Excitatory amino acid transporter-1 and -2	Sodium-dependent uptake of L-glutamate from the synaptic space
	GABA transporters 1 and 3	Sodium-dependent uptake of GABA from the synaptic space
	Glycine transporter 1	Sodium-dependent uptake of glycine glutamate from the synaptic space
	Glutamine transporter	Glutamine export from the astrocytes to neurons
Astrocyte signaling	Purinergic P2X7 and P2Y1 receptors	Fast excitatory (P2X7) and modulatory (P2Y1) effects of ATP
	Transient receptor potential (TRP) ankyrin 1 subtype channel	Tonic Ca ²⁺ influx via perisynaptic terminals
	TRP vanilloid 4 channel	Mechanosensation at the astrocyte endfeet
	Two-pore domain weak inward rectifier K channel-1 (TWIK-1)	Ammonia uptake
	Mechano-gated and arachidonic acid-activated TWIK-related channel 1	Fast glutamate release
	Bestrophin-1 (Best-1) channel	Fast glutamate and tonic GABA release
	Metabotropic glutamate (mGluR) 3 receptor	Activates TWIK1 and Best-1
	mGluR 5 receptor	Inositol triphosphate receptor 2 (IP ₃ R ₂) mediated Ca ²⁺ release from intracellular stores in response to excitatory synaptic activity
	Noradrenergic α1 receptors	IP ₃ R ₂ receptor triggered intracellular Ca ²⁺ release during arousal states
	Muscarinic cholinergic receptors	IP ₃ R ₂ receptor-triggered intracellular Ca ²⁺
Cannabinoid CB1 receptors	Activated by endocannabinoids released from neurons; activate Ca ²⁺ -triggered glutamate release from astrocytes	

Abbreviations: ATP = adenosine triphosphate; ATPase = adenosine triphosphatase; GABA = γ -aminobutyric acid; P2X = ionotropic purinergic receptor; P2Y = metabotropic purinergic receptor.

Figure 17 : Exemples de protéines membranaires présentes au niveau des astrocytes et leurs fonctions (D'après Benarroch 2016).

neurones au niveau de l'hippocampe (Balu et al., 2014) ou du cortex (Benneyworth et al., 2012). Cependant, les auteurs s'accordent à dire qu'en condition réactive, les astrocytes expriment bien la sérine racémase et peuvent ainsi synthétiser et libérer de la D-sérine (Balu et al., 2019; Li et al., 2018; Perez et al., 2017)

Pour résumer, en condition physiologique, les astrocytes participent aux fonctions liées à l'homéostasie du SNC, en communiquant directement avec les neurones *via* la recapture et la libération de gliotransmetteurs. Mais ces cellules interviennent aussi en condition non physiologique, et participent à l'induction et/ou le maintien d'états pathologiques.

V. Physiopathologie

A. La réactivité astrocytaire

En réponse à de nombreuses stimulations, les astrocytes sont activés et présentent un phénotype caractéristique de cette activation. On parle d'« Astroglie » ou d'« Astrocyte réactif ». Cet état réactif provoque de profondes modifications des astrocytes, à la fois dans leur morphologie et dans leurs fonctions. (Ben Haim et al., 2015). Il existe une très grande variété de stimulations pouvant entraîner une activation des astrocytes, comme par exemple le glutamate, les cytokines (TNF-alpha, IL6), l'ATP, facteurs neurotrophiques (cf Figure 19). La réactivité astrocytaire se caractérise d'abord par une hypertrophie progressive de la cellule, caractérisée par l'épaississement des prolongements et une augmentation de la taille du corps cellulaire et du nombre de prolongements (Figure 20) (Strömberg et al., 1986). En cas de stimulation plus importante, la réactivité astrocytaire peut entraîner une prolifération astrocytaire aboutissant à la formation d'une cicatrice gliale (Sofroniew, 2009). Le phénotype de réactivité astrocytaire est caractérisé par une augmentation de l'expression de protéines des filaments intermédiaires, expliquant pourquoi la protéine GFAP est surexprimée et constitue le marqueur le plus utilisé pour caractériser ce phénotype (Calvo and Bennett, 2012; Garrison et al., 1991; Wang et al., 2009).

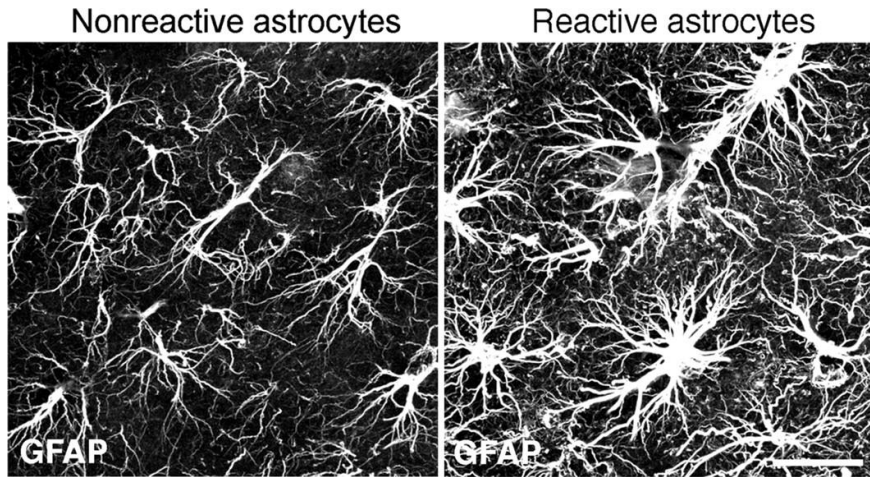


Figure 19 : Morphologie d'astrocytes corticaux marqués avec la GFAP en condition normale (gauche) et en condition réactive (droite) Barre d'échelle = 25 μ m. D'après Wilhelmsson, et al., 2006.

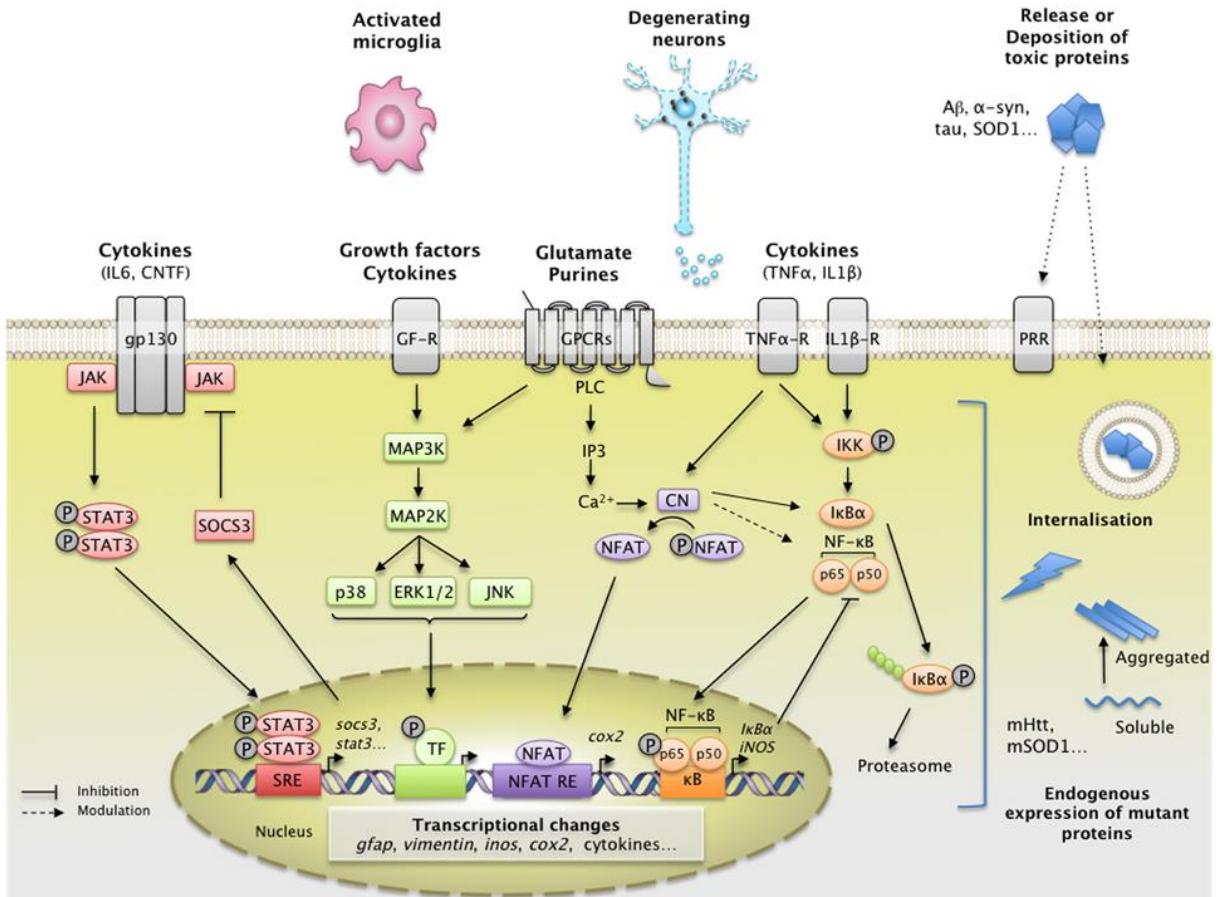


Figure 18 : Les différentes voies moléculaires pouvant être activées dans l'astrocyte. D'après Ben Hain et al., 2015. Les cellules entourant les astrocytes peuvent libérer différentes molécules, qui vont activer des récepteurs situés à la membrane des astrocytes. Les voies JAK/STAT, MAPK, NF- κ B vont ainsi être activés et entraîner des modifications dans l'activité de l'astrocyte.

De plus, les astrocytes réactifs expriment d'autres protéines utilisées comme marqueurs phénotypique comme la vimentine (Wilhelmsson et al., 2004). Les domaines occupés par les astrocytes ne se recouvrent pas en condition physiologique et sont préservés quand l'astrogliose est légère à modérée. En revanche, en cas d'astrogliose plus sévère, une prolifération astrocytaire donne lieu à la formation d'une cicatrice gliale et les prolongements astrocytaires se superposent (Sofroniew, 2009).

Après ces changements morphologiques, c'est au niveau de la fonctionnalité des astrocytes que l'on peut voir des modifications. En effet, l'activation des récepteurs astrocytaires peut entraîner l'activation de différentes voies moléculaires (Figure 21), avec entre autres les voies JAK/STAT, ERK et JNK (Ji et al., 2009). L'activation de ces voies entraîne : une modification des protéines déjà présentes, souvent une phosphorylation, des modifications dans l'expression protéique, entraînant une surexpression ou une sous-expression de protéines et la synthèse de nouvelles protéines. Notamment, en condition pathologique, les astrocytes synthétisent et libèrent des facteurs pro-inflammatoires comme des cytokines (Il-1B), des chemokines (CXCL1, CCL1) ou encore de l'ATP (Ji et al., 2013; Sofroniew, 2014).

Les astrocytes, activés en réponse à différentes stimulations ou situations, sont capables de modifier l'activité des réseaux neuronaux. La question est donc de savoir, dans quelle mesure cette activation astrocytaire participe à l'induction et/ou au maintien de de la douleur.

B. Les astrocytes et la douleur

➤ *Nociception*

Des études utilisant les outils génétiques ont permis de mettre en évidence le rôle des astrocytes dans la nociception. Une première étude, par Foley réalisé en 2011 a montré que les souris mutantes pour la protéine SNARE sous la dépendance du promoteur GFAP entraînait une diminution du seuil de retrait de la patte (Foley et al., 2011). En utilisant une approche par ARN interférant, la même procédure entraînait également une hypersensibilité mécanique (Morioka et al., 2018). L'approche optogénétique a également mis en évidence qu'une stimulation des astrocytes spinaux *via* la channelrhodopsine était suffisante pour induire une hypersensibilité à la douleur chez la souris (Nam et al., 2016).

Ces résultats suggèrent qu'en condition physiologique, les astrocytes, de par leurs nombreuses fonctions décrites précédemment, régulent la transmission des messages nociceptifs. Ainsi, en ciblant spécifiquement les astrocytes, ces résultats démontrent que l'altération de l'activité astrocytaire est suffisante à elle seule pour entraîner une altération de l'intégration des messages nociceptifs.

➤ *Douleur neuropathique*

Les premières preuves d'activation astrocytaire dans le cadre de douleurs neuropathiques sont venues de modèles animaux comme celui de ligature du nerf sciatique chez le rat (Garrison et al., 1991). Cette étude a montré une augmentation du marquage GFAP du côté de la ligature 5 jours et 10 jours après la chirurgie. Cette réactivité astrocytaire est retrouvée jusqu'à 9 mois après la lésion nerveuse, alors que les signes de réactivité d'autres types cellulaires tels que la microglie, ne sont plus présents (Gwak et al., 2012). Dans un modèle de ligature partielle du nerf sciatique, Zhuang et son équipe ont montré que l'expression de la protéine p-ERK était séquentiellement exprimée dans les neurones, la microglie puis les astrocytes (Zhuang et al., 2005). L'induction dans les neurones est immédiate mais transitoire, celle de la microglie plus tardive (après 1 jour) et disparaît à 21 jours. Le 10ème jour, p-ERK est exprimée à la fois dans les astrocytes et la microglie, mais au jour 21 principalement dans les astrocytes de la corne dorsale.

Les astrocytes semblent donc être activés plus tardivement mais cette activation perdure, suggérant un rôle des astrocytes dans le maintien et non dans l'induction de la douleur neuropathique. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études montrant que l'administration intrathécale d'une gliotoxine, le L α AA (bloquant l'activité métabolique des astrocytes (Khurgel et al., 1996), diminue la réactivité astrocytaire spinale et est capable d'abolir les symptômes douloureux une fois qu'ils sont établis (Wang et al., 2009; Zhuang et al., 2006).

D'autres études ont montré qu'en ciblant spécifiquement des voies de signalisation activées dans les astrocytes, comme la voie JAK/STAT, ERK ou JNK permettait de prévenir l'hypersensibilité mécanique chez le rongeur (Manassero et al., 2012; Tsuda et al., 2011; Zhuang et al., 2006) voir pour revue Ji et al., 2019). A partir de là, les astrocytes activés peuvent moduler l'activité des neurones via la libération des cytokines pro-inflammatoires comme

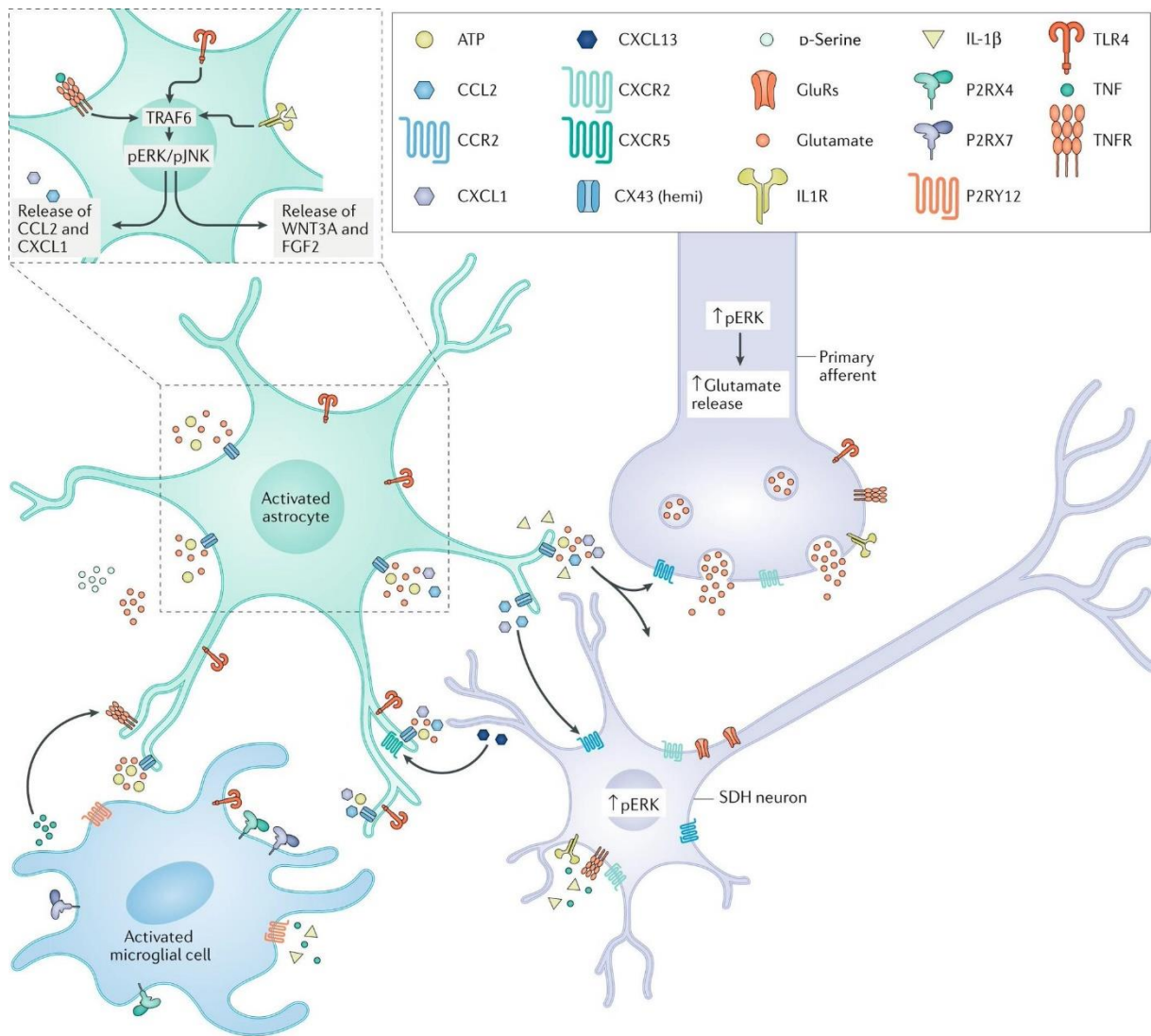


Figure 20: Mécanismes impliqués dans la douleur neuropathique. D'après Ji et al, 2019

Une lésion nerveuse induit une réactivité astrocytaire au niveau de la corne dorsale de la moelle. Cette activation va entraîner l'activation de voies de signalisation intracellulaire (JAK/STAT, JNK). Cela va entraîner la libération de médiateurs astrocytaires qui vont entraîner l'activation des cellules environnantes : microglie et neurones (pré- et post-synaptique). La microglie activée va, elle aussi, libérer des facteurs pro-inflammatoires. Ces mécanismes vont participer à la sensibilisation centrale et la transition d'une phase aiguë à la persistance de la sensibilisation entraînant la chronicisation de la douleur.

l'interleukine 1 β (IL-1 β *) (Guo et al., 2007), et des chemokines telles que la CCL2*(Gao et al., 2009; Zhang et al., 2012), CXCL13* (Jiang et al., 2016) ou CXCL1* (Ni et al., 2019).

Enfin, l'action des astrocytes dans la transmission glutamatergique est altérée en condition neuropathique. En effet, une diminution de l'expression des transporteur GLAST et GLT1 a été montrée à la suite d'une lésion nerveuse, entraînant une augmentation du glutamate présent au niveau synaptique et ainsi provoquer une hypersensibilité à la douleur (Rao et al., 2001). Enfin, un des effet des astrocytes dans la douleur neuropathique passe par la libération de D-sérine au niveau spinal (Lefèvre et al., 2015; Moon et al., 2015)

Ces résultats montrent que dans les modèles de douleur neuropathique les astrocytes sont impliqués dans les mécanismes de sensibilisation centrale qui sous-tend l'hypersensibilité à la douleur. Figure 22 issue de la revue de Ji et al., 2019.

➤ *Douleur inflammatoire*

Le rôle des astrocytes en condition inflammatoire a été moins largement décrit qu'en condition neuropathique, mais les mécanismes impliqués dans les 2 types de modèles semblent être similaires. Premièrement, dans des modèles de douleur inflammatoire (formalin, CFA, carrageenan), est retrouvée une forte réactivité astrocytaire aussi bien au niveau spinal (Gao et al., 2010; Raghavendra et al., 2004; Sun et al., 2007, Choi et al., 2017a) que trigéminal (Dieb and Hafidi, 2013; Guo et al., 2007). Les connexines 43 et l'IL-1 β sont également surexprimées dans le cas du modèle CFA (Guo et al., 2007). Une équipe a montré que bloquer les canaux voltage dépendants perméables au calcium permettait de prévenir les modifications de plasticité morphologique des astrocytes et de la microglie, et de renverser l'allodynie mécanique dans un modèle inflammatoire (Tenza-Ferrer et al., 2019). Tout comme en condition de douleur neuropathique, en condition inflammatoire les astrocytes libèrent des cytokines et chemokines pro-inflammatoires (Raghavendra et al., 2004). Par exemple, dans un modèle d'arthrite, une réactivité astrocytaire au niveau spinal a été corrélée à la libération de Fractaline qui participe aux mécanismes de sensibilisation centrale (Sun et al., 2007). Enfin, dans un modèle de douleur inflammatoire par injection de carrageenane dans une patte, le développement de l'allodynie mécanique précoce du coté ipsilatéral est bloquée par la DAAO, enzyme de dégradation de la D-Sérine alors que l'hypersensibilité plus tardive du coté contralatéral est inhibée par la carbanaléxone qui bloque les connexines 43 (Choi et al., 2017a).

➤ *Autres types de douleur*

La réactivité astrocytaire a été montrée dans des modèles de douleurs cancéreuses notamment osseuses chez le rat (Jiang et al., 2017; Song et al., 2016), les douleurs induites par le VIH chez le rat comme chez l'homme (Shi et al., 2012; Zheng et al., 2011), ou encore dans un modèle d'hypersensibilité (allodynie) par désinhibition glycinergique chez le rat (Miraucourt et al., 2011).

En résumé, les astrocytes peuvent être activés à la suite d'une douleur de nature différente (neuropathique, inflammatoire), changer leur morphologie, libérer des facteurs favorisant les mécanismes pro-inflammatoire (cytokines, chemokines) ou activant directement les neurones (glutamate, D-sérine).

Ainsi, il est maintenant évident que les astrocytes, à l'instar des autres cellules gliales, jouent un rôle clé dans le fonctionnement du SNC et que particulièrement la physiologie de la nociception ne peut être raisonnablement envisagée qu'avec la seule intervention des neurones.

Nous allons à présent discuter des arguments permettant d'envisager une implication des astrocytes dans physiopathologie de la migraine

Les astrocytes et la migraine

I. Que sait-on du lien entre astrocyte et migraine ?

Les données de la littérature soutiennent que le dérèglement des fonctions gliales, en particulier au niveau de la synapse, est impliqué dans le développement et le maintien de la douleur chronique, en particulier dans l'hypersensibilité mécanique due à la sensibilisation centrale. Dans le contexte de la migraine, il existe aussi des éléments en faveur du lien entre les cellules gliales et cette pathologie.

Une des mutations sous-tendant la migraine hémiplégique familiale concerne une protéine spécifique des astrocytes à savoir la pompe Na⁺/K⁺ ATPase. Dans un modèle génétique dans lequel cette mutation a été reproduite, les résultats montrent une mauvaise régulation du K⁺ extracellulaire entraînant une augmentation de l'excitabilité corticale qui se traduit par une facilitation de la CSD sous-tendant l'aura migraineuse (Capuani et al., 2016).

Dans un autre modèle de migraine hémiplégique familial chez la souris (mutation sous-unité α_{1A} de $Ca_v2.1$ neuronal), il a été montré une activation des cellules gliales, de la microglie et des astrocytes, au niveau cortical notamment (Magni et al., 2019). Ces résultats sont cependant liés à la migraine hémiplégique familiale qui ne représente qu'une sous-catégorie bien particulière de patient migraineux.

Des études de génomique à grande échelle ont montré que les patients migraineux présentaient des variations génétiques au niveau des astrocytes. En effet, ces travaux rapportent des polymorphismes au niveau de certains gènes astrocytaires associés à la migraine commune (gènes *GJA1*, *PRDM16*...) ou la migraine familiale hémiplégique (gènes *ATP1A2*, *HTRA1*, *SLC4A2*) (Eising et al., 2016; Renthal, 2018).

L'injection de CGRP, un peptide clé dans la migraine, au niveau du tronc cérébral entraîne une augmentation de l'expression de la protéine p-ERK au niveau des neurones, également de la Protéine Kinase A et de GFAP, démontrant une activation des astrocytes par le CGRP (Cornelison et al., 2016). Cette activation est visible à partir de 2h après injection de CGRP, elle est maximale 2 jours après l'injection et perdure au moins jusqu'à 3 jours, montrant une activation durable des astrocytes.

En clinique, une étude récente (Marciszewski et al., 2019) a étudié le cerveau de patients migraineux par imagerie du tenseur de diffusion (Diffusion tensor Imaging) permet de voir le mouvement local d'eau libre. Cela permet d'examiner les modifications de la microstructure chez l'homme en temps réel. Ces mesures de diffusion peuvent être modifiées par de nombreux processus qui modifient l'anatomie locale, comme un œdème, une inflammation, la démyélinisation ou encore des modifications du nombre de cellules et / ou de leur morphologie. Les astrocytes rentrent bien sûr dans cette dernière catégorie, puisque nous avons vu que leur activation est associée à des modifications importantes de leur morphologie. Cette étude a mis en évidence des modifications anatomiques au cours du cycle de la migraine, en particulier pendant les 24 heures précédant une crise de migraine, au niveau du Sp5C notamment. Ils supposent que ces changements anatomiques reflètent l'activation des astrocytes, qui va modifier la fonction neurale locale par la libération de gliotransmetteurs tels que le glutamate (Marciszewski et al., 2019). Cette hypothèse est intéressante puisque l'augmentation du volume des astrocytes va activer le canal ionique et osmolyte activé par le

volume (« volume-stimulated osmolyte and anion channels » (VOSAC*) et va ainsi permettre la libération de glutamate (Jackson and Madsen, 1997).

Enfin, l'implication de la microglie dans la migraine a déjà été montrée dans un modèle de migraine par injection de donneur de NO (Long et al., 2018,). Nous savons cependant que les deux types de cellules communiquent entre elles, avec notamment des récepteurs astrocytaires capables de capter les molécules pro-inflammatoires libérées par la microglie active (Sofroniew, 2014). Ainsi, la mise en évidence d'une activation microgliale pourrait appuyer l'hypothèse selon laquelle les astrocytes sont eux aussi activés dans cette condition pathologique.

D'après l'ensemble de ces éléments, la piste d'une implication astrocytaire semble judicieuse, mais à l'heure actuelle, aucune preuve directe de l'implication des astrocytes dans la migraine, ou du moins un modèle de migraine, n'a été apportée.

II. Problématique

La migraine est une maladie complexe dont la physiopathologie reste mal connue, notamment, lorsque la maladie progresse vers un stade chronique. La prise en charge du patient n'est clairement pas suffisante dans le cas chronique ou la maladie devient encore plus invalidante. La compréhension des mécanismes de transition de la forme épisodique vers la forme chronique reste insuffisante à ce jour, et constitue un préalable à une meilleure prise en charge de la maladie et une amélioration des thérapeutiques antalgiques.

Le phénomène d'hypersensibilité mécanique (allodynie) est une des caractéristiques de la progression de la migraine vers le stade chronique (marqueur) et le témoin d'une sensibilisation centrale des réseaux nociceptifs. La sensibilisation centrale sous-jacente de la migraine chronique ne peut être abordée que par le seul aspect neuronal. En effet, l'activité des astrocytes est aujourd'hui reconnue comme un élément intimement associée à l'activité neuronale (en particulier au niveau synaptique) et donc au développement et au maintien de la douleur chronique.

Ainsi, dans le cadre de l'identification des mécanismes physiopathologiques de la migraine, nous avons étudié le rôle des astrocytes dans la progression de la migraine. Pour ce faire, l'étude a été réalisée sur un modèle de progression de la migraine chez rat. Dans ce modèle développé chez le mâle (Dallel et al., 2017; Flores Ramos et al., 2017), une

hypersensibilité mécanique cutanée faciale est déclenchée à la suite d'injections systémiques répétées d'un donneur de NO (IsoSorbide DiNitrate, ISDN) et devient persistante. Le modèle par donneur de NO est pertinent car il a l'avantage d'exister chez l'homme où les donneurs de NO, largement utilisés, sont connus chez les patients migraineux comme déclencheurs de céphalées présentant les caractéristiques de la crise migraineuse. Ce modèle permet donc d'établir un lien translationnel avec les études cliniques (Akerman et al., 2019).

A partir de ce modèle, nous avons concentré nos analyses sur les mécanismes de sensibilisation centrale au niveau du premier relais des informations nociceptives : le Sp5C. En plus de l'analyse réalisée chez les animaux mâles, le modèle a été testé pour la première fois chez la femelle.

L'implication des astrocytes dans la progression de la migraine et l'hypersensibilité mécanique associée au modèle a été étudiée en recherchant les signes de réactivité astrocytaire dans le Sp5C par une approche immunohistochimique. En parallèle, l'implication astrocytaire a été analysée sur la réponse allodymique chez l'animal éveillé (mâle et femelle) et sur la sensibilisation centrale des neurones nociceptifs du Sp5C, via une approche pharmacologique par blocage de l'activité des astrocytes par une gliotoxine ou de l'activité d'un gliotransmetteur, la D-Sérine, par son enzyme de dégradation (DAAO). En effet des études antérieures au laboratoire (Miraucourt et al., 2011) et obtenus par d'autres équipes (Choi et al., 2017a; Lefèvre et al., 2015; Moon et al., 2015) ont montré un rôle important de la D-Sérine dans les mécanismes de sensibilisation centrale au niveau spinal et trigéminal.

En parallèle de ce projet de thèse, j'ai participé en collaboration avec l'ingénieur de recherche François GABRIELLI sur la relation entre le signal extracellulaire unitaire et les potentiels de champs locaux (LFP : Local Field Potential). Cette collaboration a abouti à l'élaboration d'un papier en co-premier auteur, en cours de rédaction, ajouté en annexe à la fin de ce manuscrit.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

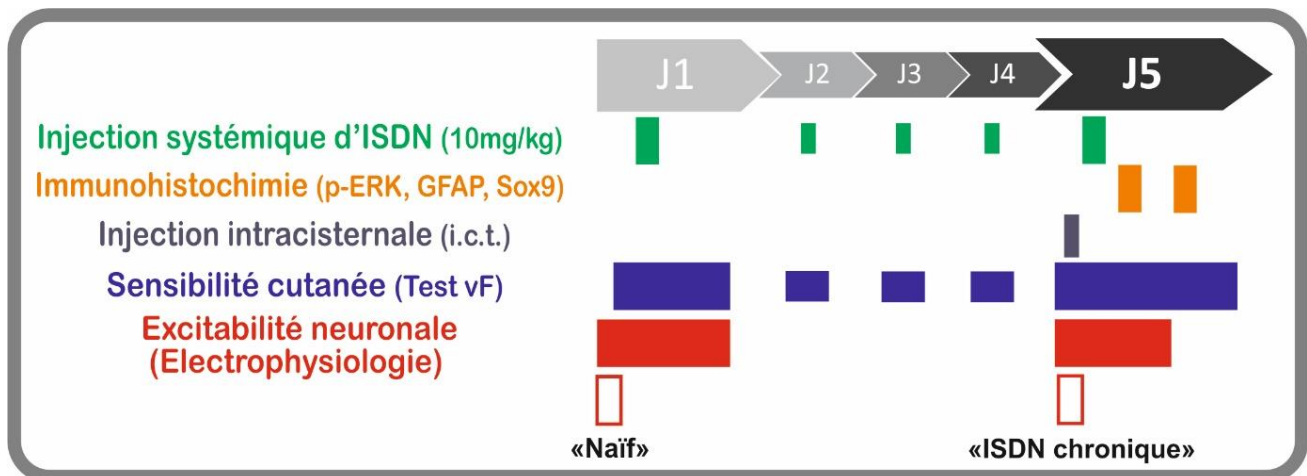


Figure 21 : Design de l'étude

Les animaux ont reçu 5 injections répétées d'ISDN (ou de sérum Physiologique), 1 injection par jour pendant 5 jours consécutifs. La sensibilité cutanée des animaux a été testée en suivi à J1 et à J5, en suivi, et à les J2 ;J3 et J4 la sensibilité cutanée a été testée avant puis une heure après ISDN ; afin de vérifier que le traitement entraînait bien une sensibilisation persistante. A J5, une étude immunohistochimique, comportementale et électrophysiologique a été réalisée. En électrophysiologie, afin de comparer l'évolution entre les animaux « Naïf » (sans aucune injection) et les animaux « ISDN chronique » (ayant reçu 4 injections d'ISDN), la réponse des neurones WDR a été enregistrée à J1. L'effet de la 1^{ère} ou de la 5^{ème} injection d'ISDN est ensuite évalué sur chacun des groupes.

I. Animaux

Les animaux utilisés dans le cadre de cette étude étaient des rats Sprague-Dawley CD, mâles et femelles, issus de l'établissement éleveur-fournisseur Charles River (L'Arbresle, France). Le poids des animaux utilisés était compris entre 200 et 350 g. Ceux-ci étaient hébergés dans des cages standards (Tecniplast) type 3 (800 cm²) à raison de 3 rats /cage. Les cages étaient enrichies à l'aide de tunnels cartons (diamètre 7 cm, longueur 15 cm). La température des salles de stabulation était maintenue et contrôlée à $22 \pm 1^\circ\text{C}$, le taux d'humidité à $55 \pm 5\%$. Les rats étaient soumis à une luminosité (100 Lux) selon un cycle nyctéméral inversé de 12h (lumière de 19h à 7h) et bénéficiaient d'un accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Les procédures réalisées sur les animaux ont été effectuées conformément aux directives éthiques de l'Association internationale pour l'étude de la douleur et à la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. L'ensemble des projets et procédures expérimentales de cette étude ont été favorablement validées par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Auvergne (CEEA-02) et autorisées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) sous les N° #3016, #7080, #12899, #18346 et #20582. Toutes les expérimentations, analyses et rapports étaient conformes aux règles ARRIVE (Animals in research : reporting in vivo experiments). Toutes les expériences ont été réalisées en aveugle. Les rats ont été randomisés dans les différents groupes expérimentaux.

II. Substances administrées

L'IsoSorbide DiNitrate (ISDN, 10mg/10mL Risordan®, Sanofi-Aventis) sous sa forme injectable a été utilisée tout au long de l'étude. L'ISDN a été utilisé à la dose de 10mg/kg par voie intra-péritonéale (i.p) ou intraveineuse (i.v). Toutes les autres substances proviennent de la société Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le liquide céphalorachidien artificiel (LCRa* ; 150 mM Na⁺, 3 mM K⁺, 0.8 mM Mg²⁺, 1.4 mM Ca²⁺, 155 mM Cl, pH 7.4, 295 mosmol kg) a été utilisé comme solvant de la D-sérine, gliotransmetteur co-agoniste des récepteurs NMDA, diluée à une concentration de 100 µg/5µL, et du L-α-aminoacide (LαAA*, A7275, 150 nmol/5µL) inhibiteur du métabolisme astrocytaire (Khurgel et al., 1996). La D-aminoacide oxydase (DAAO*, 0.17 U/5µL), enzyme de dégradation de la D-sérine (Martineau et al., 2006), a été diluée dans du LCRa additionné de Flavine Adénine Dinucléotide (FAD*) qui est un

groupement prosthétique nécessaire au fonctionnement de l'enzyme. Toutes ces molécules ont été administrées au niveau de la surface bulbaire par voie intracisternale (ict, pour un volume de 5 μ l) à l'aide d'une seringue Hamilton de 10 μ L, sous anesthésie à l'isoflurane (1.5-2%). Le même volume (5 μ L) de solvant-véhicule (LCRa pour le L α AA et D-sérine, LCRa avec FAD pour la DAAO) a été injecté pour les groupes témoins. Aucune différence entre les groupes LCRa et LCRa+FAD n'as été démontrée, les animaux ayant reçu du LCRa ou du LCRa+FAD ont été regroupés dans le groupe « Vehicule ».

Le modèle de migraine chronique utilisé (Dallel et al., 2018) est caractérisé par l'induction d'une hypersensibilité cutanée mécanique (allodynie) par l'injection i.p. répétée d'ISDN. Ces injections étaient effectuées à raison d'une injection par jour sur une période de 5 jours avec mesure de la sensibilité cutanée avant et après chaque injection. Lors du 5^{ème} jour (5^{ème} injection ISDN) les animaux recevaient en plus une injection ict préventive de LCRa, L α AA, D-sérine, FAD ou DAAO.

III. Analyse Comportementale

A. Phase d'habituation

Une semaine après leur arrivée (habituation aux conditions d'hébergement), les animaux étaient soumis aux conditions expérimentales dans des salles dédiées. Les sessions d'habituation (durée moyenne 30 min) et de test avaient lieu pendant la phase d'activité des animaux, entre 9h et 18h, dans une salle à la lumière tamisée et dont la température était contrôlée selon les même critères que pour la salle d'hébergement. Le premier jour, les rats étaient habitués à l'expérimentateur et à l'environnement des chambres de test (0.3 x 0.3 m²) adaptées à l'étude de la sensibilité faciale. Le deuxième jour, dans les chambres et cages de test, l'expérimentateur approchait plusieurs fois un filament de Von Frey près de la tête de l'animal sans le toucher. Le troisième jour, la zone de test de la sensibilité mécanique, devant et au-dessus de l'œil était stimulée avec des filaments de Von Frey d'intensité légère, non nociceptive (de 0.6g à 4g) de façon à obtenir une réaction d'orientation de l'animal vis-à-vis du stimulus et non de fuite. Le quatrième jour, les animaux sont habitués à la stimulation de filaments d'intensité plus forte (4g à 10g), de manière à obtenir un relfexe nociceptif (retrait de la face, réacion d'attaque ou de fuite, frezzing) pour les vF nociceptifs.

B. Phase de test de la sensibilité mécanique de la face

Les tests de sensibilité cutanée étaient réalisés à la suite de chaque injection i.p. d'ISDN ; soit un par jour pendant 5 jours. La méthode « up and down » (Chaplan et al., 1994) a été utilisée pour évaluer le seuil de retrait nociceptif des animaux. Par une série d'applications de différents filaments de forces comprises entre 0.6g et 15g pour la face le seuil de retrait était déterminé. Ce seuil correspond à la force mécanique minimale (filament le plus faible) nécessaire pour déclencher une réaction de retrait ou de fuite vis-à-vis d'un stimulus nociceptif (seuil de douleur). Chaque filament est testé 5 fois, le plus petit filament entraînant une réaction de retrait nociceptif au moins 3 fois sur les 5 fois est déterminé comme le seuil nociceptif. Le seuil de douleur mécanique était mesuré chaque jour de l'expérimentation (1 injection d'ISDN), avant puis toutes les ½ h après injection de substance (ISDN, aCSF, FAD, L α AA, DAAO ou D-sérine) et ce pendant 4 heures.

C. Test de psychomotricité (Rotarod)

Afin de tester l'effet des différents traitements sur la motricité des animaux, le test du rotarod (8500; Ugo Basile; Comerio, Italy) en mode accélération (4 à 40 t/min sur 5 min) a été utilisé (Jones and Roberts, 1968). Les animaux étaient soumis à une session d'entraînement-habitude la veille du test. Les sessions consistaient à tester les animaux jusqu'à ce que ceux-ci se maintiennent sur le dispositif pendant au moins 1 minute sans chuter. Le lendemain, une séance de rappel était effectuée une heure avant la mesure du maintien test sur le rotarod. Le test était effectué 20 minutes avant et 240 minutes après l'administration ict de L α AA ou de DAAO (ou de véhicule). Aucune différence n'as été induite par les substances que nous avons testée dans notre étude (Données non présentées).

IV. Immunohistochimie

A. Stimulation et perfusion

Lors du 5ème jour du protocole, les rats étaient profondément anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'uréthane 25% (1mL/100g) et étaient soumis, selon les groupes, à la dernière injection d'ISDN (10mg/kg) ou du sérum physiologique (1mL/100g) par voie intraveineuse.

Anticorps	Référence	Dilution
Anticorps monoclonal de souris anti GFAP	G 3893 SIGMA-ALDRICH	1/2000
Anticorps polyclonal de cobaye anti NeuN	ABN90 Millipore	1/2000
Anticorps polyclonal de Chèvre anti Sox9	AF3075 R&D systems	1/2000
Anticorps polyclonal de lapin anti-p-Erk 1/2	9101S Cell Signaling	1/500

Tableau 3 : Référence et dilution des anticorps primaires utilisés

Hôte	Espèce cible	Détection	Référence	Dilution
Ane	Souris	Alexa Fluor 488	715-545-151 Jackson ImmunoResearch Laboratories	1/500
Ane	Cobaye	Cy5	706-175-148 Jackson ImmunoResearch Laboratories	1/500
Ane	Chèvre	Cy3	705-165-147 Jackson ImmunoResearch Laboratories	1/250
Ane	Lapin	AlexaFluor 488	711-545-152 Jackson ImmunoResearch Laboratories	1/250

Tableau 4 : Référence et dilution des anticorps secondaires utilisés

Une heure après l'injection d'ISDN ou de sérum physiologique, chaque groupe était divisé en 2 sous-groupes de rats avec un groupe soumis à une stimulation mécanique dans la zone périorbitale avec un filament de Von Frey de 6g pendant 3 minutes à une fréquence de 1Hz et un autre sans stimulation. La valeur de filament de 6g était choisie juste en dessous du seuil nociceptif facial qui se situait à 8g, et qui donc constituait une stimulation non-nociceptive. Trois minutes après la fin de la stimulation, la cage thoracique de l'animal était ouverte, puis par voie intracardiaque était perfusée une solution saline héparinée (NaCl 0,9%, héparine 25 UI/mL, environ 100 mL/ animal) puis une solution de fixation (PBS 0,1 M, Paraformaldéhyde 4%, Acide Picrique 0,03 %) froide (10°C, environ 300 mL/animal) afin de fixer les tissus. Un autre groupe d'animaux a été réalisé dans les mêmes conditions, sans stimulation mécanique, les animaux ont été sacrifié puis les tissus prélevés 3 heures après injection d'ISDN.

Après fixation, le cerveau, les premiers segments de la moelle cervicale ainsi que les ganglions trigéminaux étaient prélevés et post-fixés pendant 2 heures dans la même solution de fixation. Deux heures plus tard les prélèvements étaient transvasés dans des tubes contenant du TBS-Sucrose (30%)-Azoture de Sodium (0,05%) et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Le sucrose fournit une cryoprotection aux tissus et l'azoture de sodium est un biocide bloquant la croissance de bactéries pendant la conservation.

B. Coupe des tissus

Des coupes transversales de 30µm d'épaisseur étaient réalisées à l'aide d'un microtome à congélation (MICROM HM450, Microm) et récupérées avec un pinceau et réparties en série dans 4 flacons contenant du TBS-Sucrose (30%)-Azoture de Sodium (0,05%) puis conservées à 4°C jusqu'à la réalisation du marquage immunohistochimique. Les ganglions trigéminaux sont coupés à l'aide d'un cryostat (Thermo Scientific® Microm HM 550) à une épaisseur de 10µm. Elles sont récupérées sur des lames en séries, puis stockées à 4°C jusqu'au protocole d'immunomarquage.

C. Marquage

La liste des solutions et anticorps primaires et secondaires utilisées sont indiqués en Table 3 et 4. Les coupes étaient rincées 3 fois dans du TBS, puis incubées 2h à température ambiante sous agitation avec la solution de saturation afin de diminuer la fixation aspécifique

des anticorps. La solution de saturation comprenait du sérum d'âne (Normal Donkey Serum : , 10%). Les anticorps primaires étaient incubés à la suite de la saturation pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, après 3 rinçages au TBS, les anticorps secondaires correspondants étaient incubés à température ambiante pendant 2 heures. Les coupes étaient ensuite montées sur lame gélatinées, puis entre lame et lamelles avec du Fluoromount G[®], ou avec du Fluoromount G[®] + DAPI afin de visualiser le noyau des cellules.

Pour le marquage p-ERK dans le Sp5C, un kit de révélation (Vector[®] Peroxydase substrat DAB) en peroxydase. L'anticorps secondaire anti-lapin est couplé à de l'avidine-biotine-Peroxydase (Immpress, Abcys ; Vector) pendant 30 minutes, puis le kit de révélation 3,30-Diaminobenzidene tetrahydrochloride (DAB) ajouté d'ammonium nickel sulfate, permettant d'obtenir un marquage noir.

D. Acquisitions et quantifications des marquages de l'étude immunohistochimique

Une fois les marquages réalisés, les lames sont acquises sur différents systèmes de microscopie, puis analysées et quantifiées par différentes méthodes en fonction de l'expérience.

➤ *p-ERK dans le Sp5C par immunoperoxydase*

Nous avons utilisé une caméra Sony DXC-950P connectée à un microscope NikonOptiphot-2 pour prendre les photos en champ clair. Les images ont ensuite été transformées en fichiers Adobe PhotoShop (CS2) pour régler la luminosité et le contraste avant de définir l'échelle de l'image. Chez chaque rat, nous avons calculé le nombre de neurones phospho-ERK+ dans les différentes couches du Sp5C selon différents plans rostrocaudaux, entre les niveaux 0 et -2400 µm par rapport à l'obex, du côté ipsilatéral et controlatéral. Le logiciel Image J[®] et le plugin « ROI manager » ont été utilisés afin de faciliter le comptage. Compte tenu de l'intervalle entre les plans de 300 µm, les cellules ne pourraient pas être comptées deux fois. Nos propres architectures myélo-architecturales combinées à l'atlas de Paxinos et Watson (2007) ont été utilisées pour réduire le MDH. Les données sont le nombre de cellules marquées / section analysées chez chaque rat.

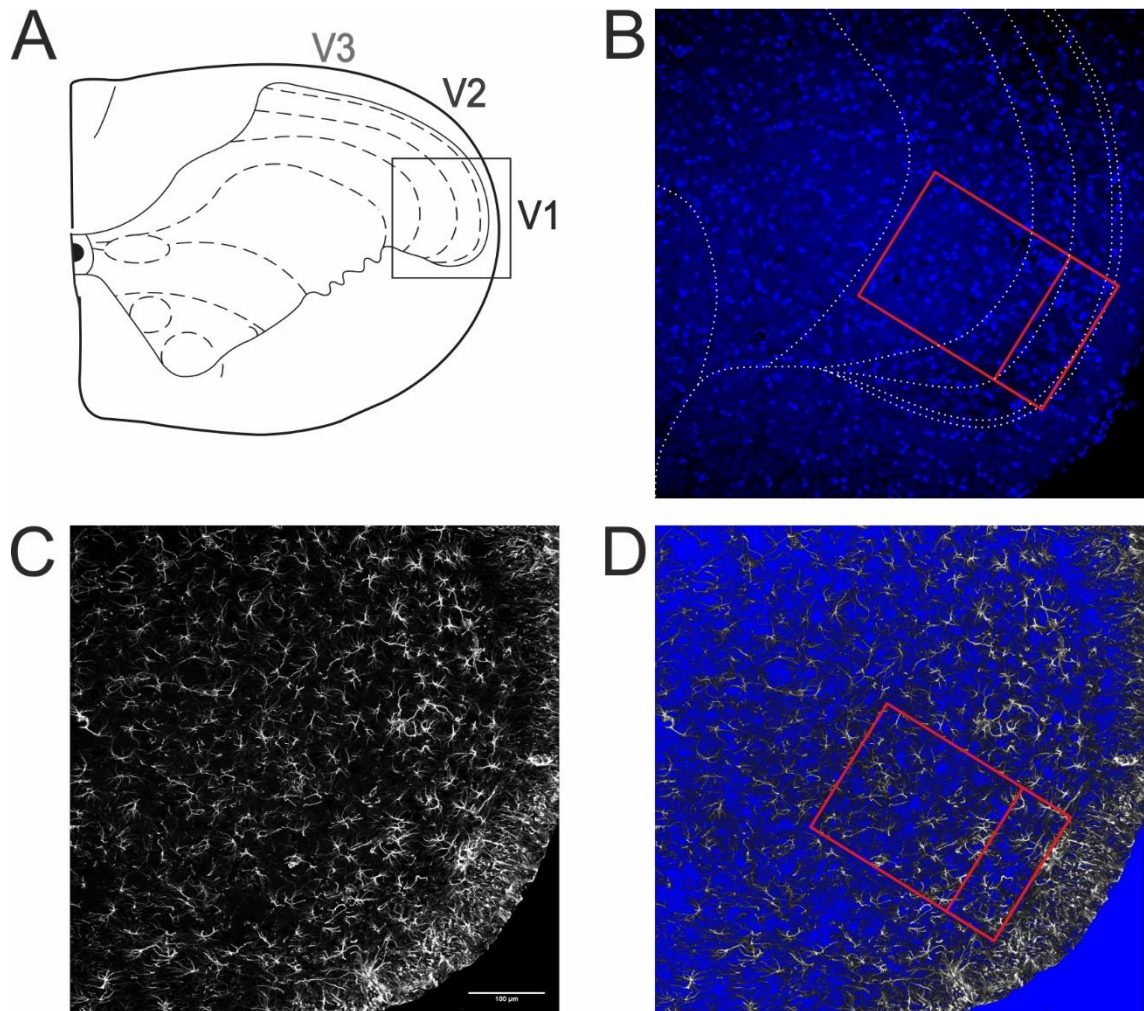


Figure 22 : Méthode utilisée pour quantifier la surface marquée par GFAP

En A : Schémas de l'organisation laminaire retrouvé au niveau du Sp5C. B : Marquage nucléaire (DAPI) permettant de visualiser la couche I et ainsi de placer la fenêtre de quantification parallèle à celle-ci (= Region Of Interest : ROI*). C : Marquage GFAP obtenus pour cette coupe. D : Seuillage du marquage GFAP (Blanc = pixels inclus dans le seuil). La surface marquée correspond ainsi au % de pixels inclus dans le seuil par rapport au nombre total de pixel dans la ROI

➤ *P-ERK dans le ganglion trigéminal par immunofluorescence*

Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence Axioplan (Zeiss) couplé à une caméra digitale Hamamatsu (C4742-95). D'après la morphologie du ganglion trigéminal, nous avons pu différencier la zone correspondant à la branche V3 (mandibulaire) et V1/V2 (ophtalmique/maxillaire).

Pour chaque animal, nous avons calculé le nombre de neurones phospho-ERK+ dans la zone V1/V2 du ganglion trigéminal, du côté ipsilatéral et controlatéral. 3 coupes de ganglions ont été choisis pour chaque animal/côté, non consécutives sur la lame, assurant d'avoir au moins 100 µm entre les 2 prises d'image, afin de ne pas compter 2 fois une même cellule. Le logiciel Image J® et le plugin « ROI manager » ont été utilisés afin de réaliser le comptage. Les données présentées sont le nombre total de cellules marquées sur les 3 prises de vues chez chaque rat.

➤ *GFAP dans le Sp5C.*

Les coupes de Sp5C ont été analysées avec un microscope à balayage laser confocal ZEISS® LSM 800. Les séries Z ont été balayées avec des grossissements × 20 avec un pas Z de 0,80 µm. Chaque image a ensuite été analysée avec le programme ImageJ®. Nous avons travaillé sur la projection orthogonale maximale pour l'ensemble de nos analyses.

La réactivité astrocytaire a été évaluée en mesurant la surface occupée par le marquage immunohistochimique GFAP+ entre les différentes conditions, dans l'aire V1 du Sp5C, avec une fenêtre de quantification rectangulaire mesurant 200x 300 µm (Cf Figure 24). La fenêtre est positionnée grâce au marquage DAPI, qui permet de voir la répartition cellulaire caractéristique entre les différentes couches du Sp5C, semblable à celle retrouvée dans la moelle. Notamment, elle permet de différencier la couche I composée de neurones de projection dont le noyau est allongé, répartis en une couche unicellulaire. La fenêtre de quantification est positionnée parallèle à cette couche I en incluant celle-ci. La fenêtre est sous-divisée en 2 : De 0 à 80 µm, nous avons la partie correspondant aux couches I et IIe, de 80 à 200 µm nous avons la couche IIIi et III (Lorenzo et al., 2008).

Ensuite, un seuillage est appliqué à l'image pour permettre de définir au sein de l'échelle de gris de quels sont les pixels positivement marqués GFAP+. Un échantillon d'images choisit en aveugle a permis définir le seuil optimal permettant de dissocier le bruit de fond du

marquage spécifique. Le logiciel quantifie alors l'aire de chaque ROI ainsi que la surface totale occupée par le marquage (défini grâce au seuillage) au sein de chaque ROI, ainsi que le % de la ROI marqué. Ces valeurs sont celles utilisées pour comparer le marquage GFAP en fonction des conditions.

➤ *p-ERK, NeuN et Sox9*

Ce triple marquage a été réalisé au niveau du Sp5C afin de caractériser le type cellulaire exprimant p-ERK. Le marquage Sox9 sera également utilisé pour compter le nombre d'astrocytes en fonction des conditions expérimentales. Les coupes de Sp5C ont été analysées avec un microscope à balayage laser confocal ZEISS® LSM 800. Les séries Z ont été balayées avec des grossissements $\times 20$ avec un pas Z de 0,80 μm . Afin de s'assurer de la spécificité de chaque marquage, le microscope a été configuré pour effectuer tous les balayages en mode séquentiel. Les images ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J®.

V. Enregistrements électrophysiologiques unitaires extracellulaires *in vivo*

A. Préparation chirurgicale

L'animal était placé dans une cuve pour anesthésie par inhalation d'isoflurane (Isoflurin®, Axience, France) à 2% dans un mélange protoxyde d'azote/oxygène (2/3-1/3). Une fois l'animal anesthésié (via masque), une trachéotomie est pratiquée afin d'introduire un cathéter et relier la trachée à une pompe à respiration artificielle. Un système de monitoring gazeux (Dragër®, Vamos, Germany) était relié à la canule trachéale pour permettre un suivi de la pression partielle en CO₂, du niveau d'anesthésique et du mélange O₂/N₂O. La carotide gauche de l'animal était ensuite canulée puis reliée à un capteur de pression artérielle (UFI, Morro Bay, CA, USA) connecté à un amplificateur (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) permettant un monitoring continu de l'animal. Ce système était relié à un ordinateur via une interface analogique/numérique (Cambridge Electronics Design 1401 computer interface). Enfin, la veine jugulaire gauche était également canulée pour permettre la perfusion d'une solution de curare (Norcuron®, MSD) administrée par une pompe (0.6 mg/h), et qui permettait de bloquer les activités musculaires pouvant perturber l'enregistrement électrophysiologique. Cette voie était également utilisée pour l'injection intraveineuse d'ISDN au cours de l'expérimentation.

La température de l'animal était mesurée grâce à une sonde rectale et régulée grâce à un matelas chauffant afin de la maintenir à $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Après cette première étape, le rat était fixé sur un cadre de stéréotaxie de type Horsley-Clarke adapté à la sphère orofaciale. Une incision cutanée médiane était réalisée au niveau du crâne et du cou, au-dessus du bulbe et de l'os occipital.

Après avoir dégagé les muscles du cou et incisé la membrane atlanto-occipitale, un accès au bulbe était aménagé afin de localiser latéralement le Sp5C au niveau du noyau spinal du trijumeau droit. Afin de permettre la stimulation des méninges, une craniotomie était réalisée à l'aide d'une fraise sur une surface du crâne d'approximativement 10x15mm (cette fenêtre servira également à mesurer la microvascularisation, cf. paragraphe suivant). De l'aCSF froid était continuellement appliqué lors de la craniotomie afin de réduire l'échauffement du tissu lors du fraisage et pour éviter l'assèchement des méninges une fois exposées. Une fois la craniotomie terminée, de l'huile de paraffine à température ambiante ($20-25^{\circ}\text{C}$) était appliquée sur les méninges afin d'éviter un dessèchement du tissu.

B. Enregistrements des neurones à convergence

➤ *Matériel*

Les enregistrements unitaires extracellulaires étaient réalisés à l'aide de microélectrodes en verre remplies d'un mélange bleu de pontamine 8% - NaCl 5%. Ces microélectrodes étaient réalisées en étirant (étireuse PE-2, Narishige Instruments) des micropipettes de verre (diamètre interne/externe : 0.69/1.2mm ; longueur : 150 mm). Leur pointe était ensuite cassée de façon à ce que l'impédance de la microélectrode soit comprise entre 2 et 8 MOhms. L'électrode, montée sur un portoir avec descendeur était connectée via un fil d'argent à un adaptateur d'impédance. Le signal était ensuite amplifié à l'aide d'un amplificateur différentiel (WPI®, ISO-DAM8a). Pour l'enregistrement, les paramètres d'acquisition étaient réglés avec un filtre coupe bande de 50 Hz, un filtre passe-haut de 10 KHz, un filtre passe-bas de 300 Hz, un gain de 10^3 . Le signal était traité via un Hum Bug (Quest Scientific®) afin de soustraire le bruit puis visualisé sur un oscilloscope cathodique (HAMEG® ; Oscilloscope HM507). Un discriminateur (WPI, 121 Windows discriminator) permettait d'intégrer en direct le nombre d'évènements comme les potentiels d'action. L'ensemble des signaux étaient transmis via une interface analogique/numérique CED 1401plus® (Cambridge

Electronic Design) vers un ordinateur PC pour un traitement via le logiciel Spike 2® (version 6.16). Le logiciel permettait d'analyser en temps réel les résultats sous différentes formes : signaux bruts et post-stimulus histogrammes (PSTH*) et de faire aussi un suivi en continu de l'évolution du rythme cardiaque et de la pression artérielle. Les PSTH permettait de classifier les potentiels d'actions évoqués comme étant dû à la mise en jeu des fibres A (≤ 30 ms) ou C (entre 30 et 200 ms).

Une caméra (DinoLite® Digital microscope PREMIER) était placée au-dessus de l'ouverture du bulbe afin de faciliter le placement et la descente de la microélectrode d'enregistrement.

➤ *Recherche et caractérisation des neurones nociceptifs*

La micro-électrode était descendue à l'aide d'un micro-descendeur « trois axes » (Unimécanique, France), lentement à partir du contact avec la surface du Sp5C. A partir de là, commençait la recherche des champs récepteurs en appliquant un léger stimulus mécanique (brossage cutané avec pinceau) ou un stimulus électrique transcutané dans la région péri-orbitale et/ou méningé.

Les neurones enregistrés étaient des neurones à convergence ou WDR (Wide Dynamic Range) qui représentent 80 % des neurones nociceptifs et sont situés dans les couches profondes du Sp5C. Ils étaient identifiés grâce à leur réponse aux stimulations mécaniques et/ou électrique au niveau de leurs champs récepteurs cutanés et méningés. En effet, ces neurones répondent à la fois aux stimulations non-nociceptives (pression légère ou brossage à l'aide d'un pinceau) et également aux stimulations nociceptives (pincement, pression forte). De plus, ces neurones codent l'intensité de la stimulation c'est à dire que leur réponse est proportionnelle à l'intensité de stimulation. Si un neurone répondait à ces différents critères, étaient appliquées, au centre de son champ récepteur cutané, des stimulations électriques. Ces stimulations étaient appliquées à l'aide d'une paire d'électrodes métalliques (0.35 x 15 mm) implantées dans la peau, ou bien des électrodes en argent à têtes sphériques étaient appliquées sur les méninges. Dans le cas des neurones WDR, les réponses à la stimulation électrique (durée 2ms pour la peau, 1ms pour les méninges), sous forme de potentiel d'action, présente des réponses à courte latence liées à la mise en jeu des afférences primaires de type A et des réponses à longues latences liées à l'activation des fibres de type C. Connaissant à la fois la distance entre le site de l'enregistrement et le site de stimulation cutanée mais aussi la

vitesse de conduction des fibres A et C, il est facile de déduire sur l'enregistrement les potentiels d'action qui sont liés à l'activation de tel ou tel type de fibre. Dans le cas des enregistrements effectués dans le Sp5C, les potentiels d'action présentant des latences inférieures à 4 ms étaient considérés comme liés aux fibres myélinisées A β , ceux compris entre 7 et 30 ms, aux fibres peu myélinisées de type A δ et ceux dont les latences étaient supérieures à 30 ms étaient liés à la mise en jeu des fibres amyéliniques C (considérées comme les vectrices majeures du nociception). Enfin, les potentiels d'action détectés après 200 ms étaient catégorisés comme une post décharge des fibres de type C.

➤ *Mesure du champ récepteur*

Une fois un neurone WDR isolé, les limites de son champ récepteur étaient définies en appliquant des filaments de Von Frey sur la peau et/ou les méninges. L'aire cutanée ou méningée dont la stimulation mécanique entraînait une réponse du neurone était délimitée comme le champ récepteur de ce neurone. Les 2 aires (cutanée et méningée) étaient ensuite reportées sur un schéma pour chacune des cellules enregistrées. Le champ récepteur était testé régulièrement au cours de l'expérimentation pour noter une éventuelle différence (augmentation ou diminution) en fonction des traitements.

➤ *Mesure des seuils d'activation et latences des différentes réponses*

Les seuils (mesurés en mA) des différentes réponses liées aux différents types de fibres mises en jeu (A β , A δ et C) étaient évalués grâce à des stimulations électriques. Par une méthode d'up and down, différentes stimulations électriques étaient appliquées afin de mesurer l'intensité minimale nécessaire pour détecter un potentiel d'action apparaissant à une latence correspondant à la mise en jeu de chaque type de fibre.

➤ *Protocole expérimental*

Les 2 types de stimulation électriques et mécaniques étaient appliqués sur les différents territoires sous forme de séries réalisées toutes les 10 minutes. Les séries de stimulations électriques et mécaniques étaient alternées et présentaient les caractéristiques suivantes :

- Pour les stimulations électriques, il s'agissait de séries de 30 stimulations appliquées à une fréquence de 0.66Hz, d'une durée de 2ms d'une intensité égale à 2 fois le seuil d'activation des fibres C.

- Les stimulations mécaniques au niveau de la peau consistaient en des séries composées d'une stimulation dynamique, brossage avec un pinceau pendant 10 secondes à 1Hz, suivie d'une séquence d'application de 3 Filaments de von Frey appliqués pendant 10 secondes (1 von Frey nociceptif (8g), 1 von Frey seuil pour lequel la cellule répond et 2 von Frey infra seuil).

Pour chaque neurone enregistré, des enregistrements (contrôles) témoins (à la fois pour la série de 30 stimulations électriques et la stimulation mécanique) étaient réalisés au début de l'expérimentation. La réponse C cutanée (réponses aux latences tardives, > 30ms) devait être stable (moins de 10% de variation entre les 2 enregistrements témoins). Une fois ces contrôles réalisés, le protocole expérimental était réalisé pour tester l'effet de l'administration i.v. d'ISDN (10mg/kg) ainsi que l'effet préventif du L α AA ou de la DAAO sur l'évolution de la réponse du neurone. Dans le but de servir de contrôle pour les tests pharmacologiques, en condition contrôle du LCRA ou LCRA+FAD était appliqué au niveau du Sp5C. La durée de l'enregistrement dépendait de la stabilité de la préparation, mais en moyenne les réponses nociceptives des neurones étaient enregistrées sur une durée de 2 heures post injection ISDN, et plus longtemps lorsque la préparation restait stable. Un marquage du site d'enregistrement était ensuite effectué par iontophorèse de la solution de Pontamine contenue dans la microélectrode de verre. L'animal était euthanasié en fin de manipulation par l'administration i.v. de pentobarbital (150 mg/kg). L'encéphale était prélevé et plongé dans une solution de formol (10%) en attente du traitement histologique pour localiser le site d'enregistrement.

➤ *Analyse des enregistrements*

- *Analyse des potentiels d'action*

Le traitement et l'analyse des enregistrements étaient effectués à posteriori de l'expérimentation. Les données étaient analysées avec le logiciel Spike2® qui réalisait des « modèles » en fonction de la forme des potentiels d'action enregistrés. Ceux-ci étaient classés en fonction de leur forme et de leur taille. Ainsi l'identification de la forme et de la taille des potentiels d'action permettait de discriminer le message spécifique d'une cellule en éliminer les événements parasites correspondant comme l'artéfact de stimulation électrique ou des signaux liés à l'activité d'autres cellules captées au cours de l'enregistrement. Seules les cellules présentant un signal de taille et d'une forme stable au cours de l'enregistrement

étaient analysées et comptabilisées. Les contrôles (stables) des cellules dont la stabilité au cours de l'enregistrement n'a pas pu être confirmée ont été comptabilisés afin de comparer les conditions contrôle entre elles, mais pas pour les autres analyses.

- Comptage du nombre de potentiels d'action

Nous avons compté le nombre de potentiels spontanés et évoqués par une stimulation, électrique ou mécanique. Pour les stimulations électriques, les PSTH* (Post Stimulus Time Histogram) permettaient de compter automatiquement le nombre de potentiels d'action émis lors de la série de stimulations électriques. Ainsi, les potentiels d'action détectés entre 7 et 30 ms après la stimulation électrique étaient comptabilisés comme provenant de la mise en jeu des fibres A δ , ceux entre 30 et 200 ms comme provenant des fibres C. Il est à noter que les messages dus à la mise en jeu des fibres A β n'ont pas pu être mesurés car perturbés par l'artefact de stimulation important (2x le seuil des fibres C, 2ms). Nous avons concentré notre étude sur la réponse provenant des fibres C, principales vectrices de la nociception.

Pour les stimulations mécaniques, le nombre de potentiels d'action émis était compté au cours de la stimulation dynamique ou statique (10 secondes de stimulation avec pinceau dynamique ou avec von Frey statique). Lorsque les cellules présentaient une activité spontanée, le nombre de potentiels d'actions émis pendant les 10 secondes de stimulations mécaniques était normalisé par rapport au nombre de potentiels d'actions émis pendant les 10 secondes précédant la stimulation mécanique.

Pour l'activité spontanée, la mesure portait sur le nombre de potentiels d'action émis pendant une minute, entre 2 phases de stimulation. Si l'activité spontanée était variable, l'activité spontanée moyenne a été comptabilisée sur plusieurs minutes entre les stimulations afin de refléter au mieux l'activité spontanée de la cellule.

- Analyse histologique des sites d'enregistrements

A la fin de chaque enregistrement électrophysiologie, un marquage par point bleu est réalisé au site d'enregistrement. Un courant négatif de 1 à 5 μ A est imposé pendant 30 minutes via l'électrode d'enregistrement qui contient du bleu de Pontamine. A la fin de l'expérience, l'animal est mis à mort par une dose létale de pentobarbital (150 mg/kg). Le bulbe est prélevé puis fixé dans du formol 30% avant de pouvoir réaliser des coupes histologiques à l'aide d'un microtome à congélation (MICROM HM450, Microm). Des coupes

coronales de 90 µm sont réalisées puis montées directement sur des lames gélatinées, observées au microscope pour repérer le site d'enregistrement puis photographiées. Les sites d'enregistrements sont ensuite reportés sur un schéma anatomique du Sp5C.

VI. Mesure de la vascularisation des méninges

Comme nous avons travaillé sur un modèle de migraine par injection de donneur de NO, il était intéressant d'étudier la vascularisation des méninges afin de savoir si celle-ci pouvait être corrélée avec l'activité des neurones WDR trigéminaux que nous enregistrons en parallèle.

Pour cela nous avons utilisé le système PeriCam PSI Normal Resolution de la marque Perimed® (Perimed Inc., Jarfalla, Sweden). L'analyse par contraste des taches au laser (« Laser speckle contrast analysis » LASCA*), est une méthode permettant de visualiser instantanément la perfusion sanguine dans les tissus microcirculatoires. Lorsqu'un objet est éclairé par une lumière laser, la lumière renvoyée par cet objet et va former un motif d'interférence constitué de zones sombres et lumineuses. Ce motif s'appelle un motif de chatolement (ou « speckle pattern »). Si l'objet illuminé est statique, le motif de chatolement est immobile. Lorsqu'il y a un mouvement dans l'objet, tel que des globules rouges dans un tissu, le motif de chatolement changera avec le temps. Dans le système PeriCam PSI, une caméra CCD avec une durée d'exposition fixe enregistre ces modifications du motif de chatolement, générant un « flou » qui va être enregistré. En fonction du degré de mouvement dans la zone de l'image, le niveau de flou sera différent. C'est sur ce principe que repose l'enregistrement de la perfusion sanguine du système que nous avons utilisé. Le système PeriCam PSI utilise un laser invisible proche infrarouge (785 nm) pour les mesures de perfusion sanguine. Le faisceau est réparti sur la zone de mesure par un diffuseur, créant un motif de chatolement. La perfusion sanguine en utilisant les unités arbitraires, les unités de perfusion (PU). Les enregistrements sont réalisés à l'aide du logiciel Pimsoft® qui contrôle la caméra, le laser et réalise l'ensemble des calculs.

- Mise en place de la caméra et enregistrement de la perfusion

La caméra a été placée au-dessus du crâne de l'animal à la fin de la procédure chirurgicale. La distance entre les méninges et la caméra a été contrôlé via le logiciel pour être à 10cm, qui correspond à la distance optimale pour nos enregistrements.

L'enregistrement a été réalisé en continu, lorsque les conditions physiologiques de l'animal (pression artérielle, pCO₂) étaient stables. L'injection d'ISDN a été réalisée après une période de contrôle où la perfusion, visible en direct sur le logiciel PimSoft[®], était stable durant au moins une dizaine de minutes. Un marqueur a été placé en début et en fin d'injection afin d'établir le timing de l'effet observé. L'enregistrement a ensuite continué pendant 2 heures après injection d'ISDN, c'est-à-dire la durée totale des enregistrements électrophysiologies extracellulaires.

- **Extraction des données et analyse**

Les données brutes de perfusion ont été extraites du logiciel Pimsoft[®] sous le format .dat et analysés à posteriori avec le logiciel sur MathLab[®], à l'aide d'un code développé spécifiquement pour cette étude par notre ingénieur de recherche. Les données de perfusions ont été synchronisées avec l'évolution de la pression artérielle enregistrée en parallèle via le logiciel Spike[®] grâce aux repères d'injections ajoutés par l'expérimentateur sur les 2 enregistrements.

VII. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 7.00. La normalité des données a été testée avec de Shapiro-Wilk, afin de savoir si le test statistique utilisé sera paramétrique ou non-paramétrique. Le test t-de student (ou Mann-Whitney en cas de distribution non normale) a été utilisé pour comparer 2 conditions. Pour comparer l'effet d'un traitement en fonction du temps, une Anova à une voie (Ou test de Friedman en non-paramétrique) en mesure répétée suivie du test post-hoc de Dunett (ou de Dunn's) a été utilisée. Enfin, pour comparer l'effet de plusieurs traitements, une Anova à deux voies suivis du test de Dunett (comparaison par rapport aux contrôles) ou de Sidak (comparaison des traitements entre eux) ont été utilisés. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne \pm SEM. Les niveaux de significativité étaient fixés à $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

Chapitre 3 : Résultats

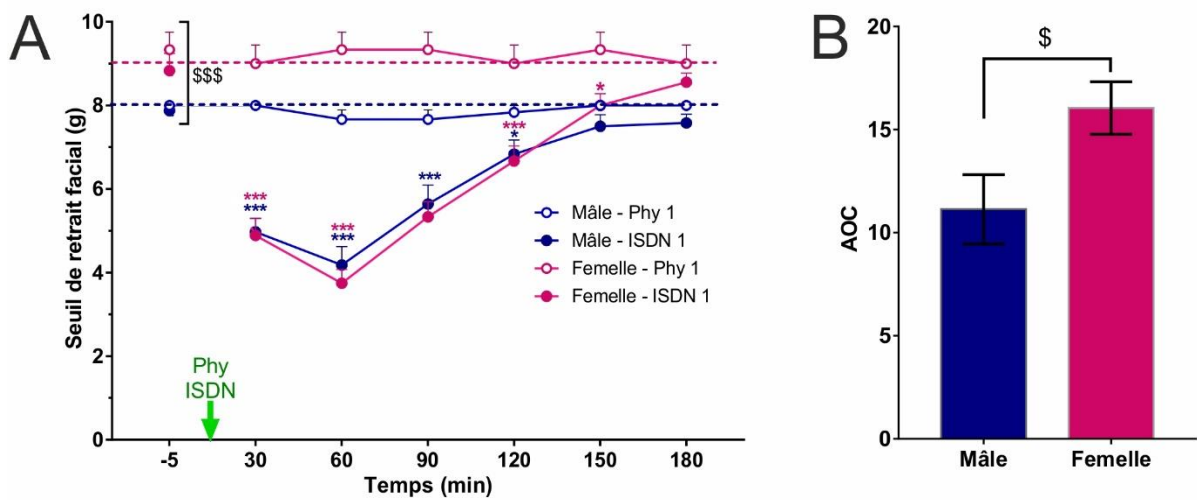


Figure 23 : Modification de la sensibilité mécanique cutanée faciale après injection i.p. aigue d'ISDN 10 mg/kg (ISDN-1).

(A) L'ISDN entraîne une allodynie céphalique maximale à 60 minutes post-injection chez le mâle et la femelle ($n=24$, groupe mâle, $n= 18$ groupe femelle) et qui reviens en 120 minutes pour les mâles, et 150 minutes pour les femelles ($***p < 0,001$, comparaison avec la valeur avant injection d'ISDN). Avant injection d'ISDN, les seuils de retrait facial sont significativement différents entre mâle et femelle ($$$$ p < 0,001$) ; (B): La valeur d'allodynie (AOC calculées par rapport aux lignes en pointillés définissant le seuil moyen en condition contrôle) chez la femelle est supérieure à celle du mâle ($\$ p = 0,034$).

L'ISDN entraîne une sensibilisation trigéminal

I. Approche Comportementale (test de von Frey)

Nous avons testé l'effet de l'injection d'ISDN sur la sensibilité cutanée faciale à l'aide de filaments de von Frey. Cette étude a été réalisée après une injection d'ISDN, avec un suivi toutes les 30 minutes pendant 3 heures. Les injections sont répétées tous les jours pendant 5 jours, et le 5^{ème} jour nous réalisons un suivi toutes les 30 minutes pendant 4 heures.

A. ISDN 1 injection

L'effet d'une injection d'ISDN a été étudié chez le mâle mais également pour la première fois chez la femelle. Nos résultats chez le mâle ont montré que l'injection d'ISDN (10 mg/kg i.p.) entraînait une allodynie cutanée transitoire au niveau de la face chez le mâle, traduit par une baisse significative du seuil de retrait de la face à partir de 30 minutes ($7,87 \pm 0,125$ g avant injection d'ISDN vs $4,97 \pm 0,33$ g, $n = 24$, $p < 0,0001$), elle est maximale à 60 minutes ($4,18 \pm 0,33$ g) après l'injection et dure jusqu'à 120 minutes ($6,83 \pm 0,27$ g, $p = 0,0009$ (Figure 25 (A))).

Chez la femelle, nous avons pu constater que le seuil de retrait facial basal des femelles était significativement plus élevé par rapport à celui des mâles ($8,96 \pm 0,33$ g, $n = 24$ vs $7,93 \pm 0,125$ g, $n=32$, $p = 0,0011$, les animaux des groupes Phy et ISDN ont été groupé pour cette comparaison puisque le seuil basal a été mesuré avant toute injection).

L'injection d'ISDN a provoqué le même effet chez la femelle, à savoir une allodynie céphalique significative à partir de 30 minutes ($8,83 \pm 0,41$ g vs $4,89 \pm 0,41$ g), qui atteint son maximum à 60 minutes ($3,74 \pm 0,36$ g) et dure jusqu'à 150 minutes ($8,0 \pm 0,28$, $n=18$, $p = 0,041$). Il est à noter que chez les animaux mâles, l'allodynie céphalique a duré 120 minutes après l'injection d'ISDN avec un retour au seuil basal à 150 min. Chez les femelles, par contre, le retour au seuil basal est plus tardif, à 180 minutes. De plus, l'aire sur la courbe (Area Over the Curve AOC*) était plus importante dans le groupe femelle ($11,14 \pm 1,679$, $n=24$ pour les mâles vs $16,05 \pm 1,275$, $n=18$ pour les femelles $\$p=0,034$). Ainsi, les résultats montraient que la durée de l'allodynie chez les femelles, après 1 injection unique d'ISDN, était plus importante.

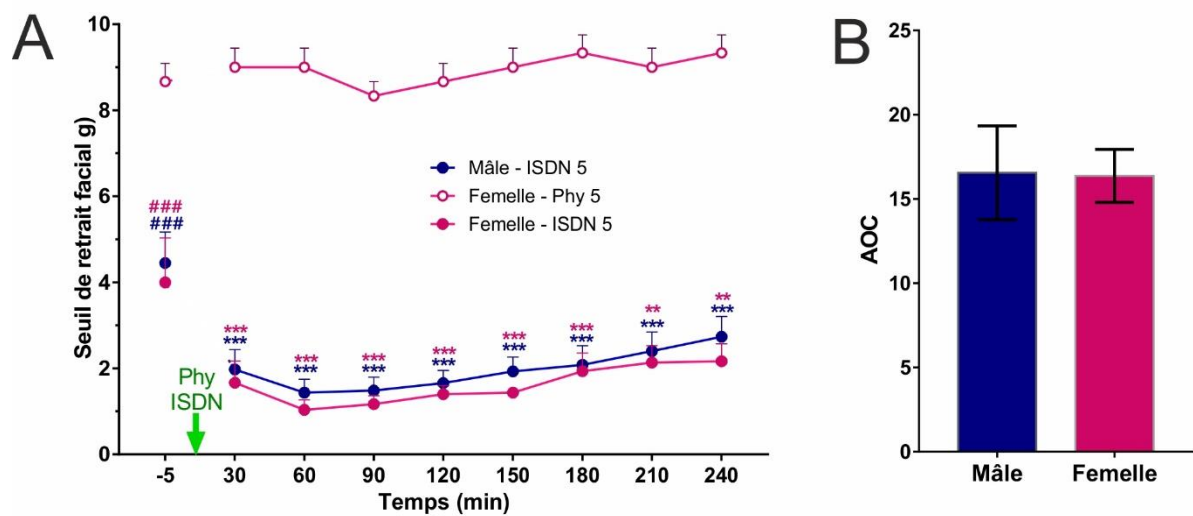


Figure 24 : Modification de la sensibilité mécanique cutanée faciale après injection répétée i.p. d'ISDN 10 mg/kg (ISDN-5).

(A) Par rapport aux valeurs contrôles (injection de sérum physiologique Phy5) la 5ème injection d'ISDN entraîne une allodynie céphalique chez le mâle et la femelle (n=6-8 par groupe) ; Avant la 5ème injection d'ISDN, les seuils de retrait facial chez le mâle et la femelle sont équivalents mais significativement différents des seuils en conditions contrôles (### p<0.001) ; (B) : Les valeurs d'allodynie, calculé avec l'AOC chez le mâle et la femelle sont équivalentes. NB : le seuil moyen en condition contrôle (Phy) chez le mâle (8g) n'a pas été re-testé et correspond à celui rapporté par les études antérieures du laboratoire (Dallel et al, 2017).

B. ISDN 5 injections

L'analyse des effets de la répétition des injections d'ISDN a montré une aggravation et une persistance de l'allodynie mécanique cutanée. Premièrement, la répétition des injections entraîne une persistance de l'allodynie céphalique, car le seuil de retrait facial avant la 5^{ème} injection d'ISDN est significativement différent par rapport à celui à J1 ($7,93 \pm 0,125$ vs $4,45 \pm 0,72$ chez les mâles, $n=8$ et $8,96 \pm 0,33$ g vs $4,0 \pm 1,03$ g pour les femelles, $n=6$, $p < 0,001$ ###). A J5, le seuil basal entre mâle et femelle n'est cependant pas différent.

Si on regarde l'évolution de la sensibilité mécanique après la 5^{ème} injection d'ISDN, elle a les mêmes effets chez les animaux mâles et chez les animaux femelles. En effet, le seuil de retrait facial est significativement plus bas dès 30 minutes après ISDN aussi bien pour les mâles ($4,45 \pm 0,72$ g avant ISDN-5, $1,09 \pm 0,46$ g 30 minutes post-ISDN) que pour les femelles ($4,0 \pm 1,03$ g avant ISDN-5, $1,67 \pm 0,50$ g 30 minutes après ISDN-5). Cette effet persiste jusqu'à la fin du suivis, soit 240 minutes. L'absence de différence dans l'effet de ISDN-5 se reflète sur l'AOC entre animaux femelles et mâles qui n'est pas significativement différente ($16,55 \pm 2,78$ pour les mâles vs $16,38 \pm 1,57$ pour les femelles, $p=0,95$). Nous n'avons pas testé l'effet de 5 injections de sérum physiologique chez les animaux mâle, car ceci à déjà été réalisé dans les études antérieures du laboratoire et n'as montré aucune modification dans la sensibilité céphalique des animaux (Dallel et al., 2018).

Pour conclure, les résultats obtenus en aigu et en chronique chez les mâles et femelles ont montré : une sensibilité céphalique significativement plus importante chez les femelles par rapport au mâle, et un effet plus important de l'ISDN en aigu chez les animaux femelles. En condition chronique, la persistance de l'allodynie céphalique après 4 injections d'ISDN a été retrouvée à la fois chez les mâles et les femelles, le seuil après 4 injection d'ISDN étant le même pour les 2 groupes d'animaux. La 5^{ème} injection d'ISDN entraînait une diminution du seuil de retrait de la face similaire chez les animaux des 2 sexes : la répétition des injections d'ISDN entraînaient une sensibilisation persistante similaire indépendamment du sexe des animaux.

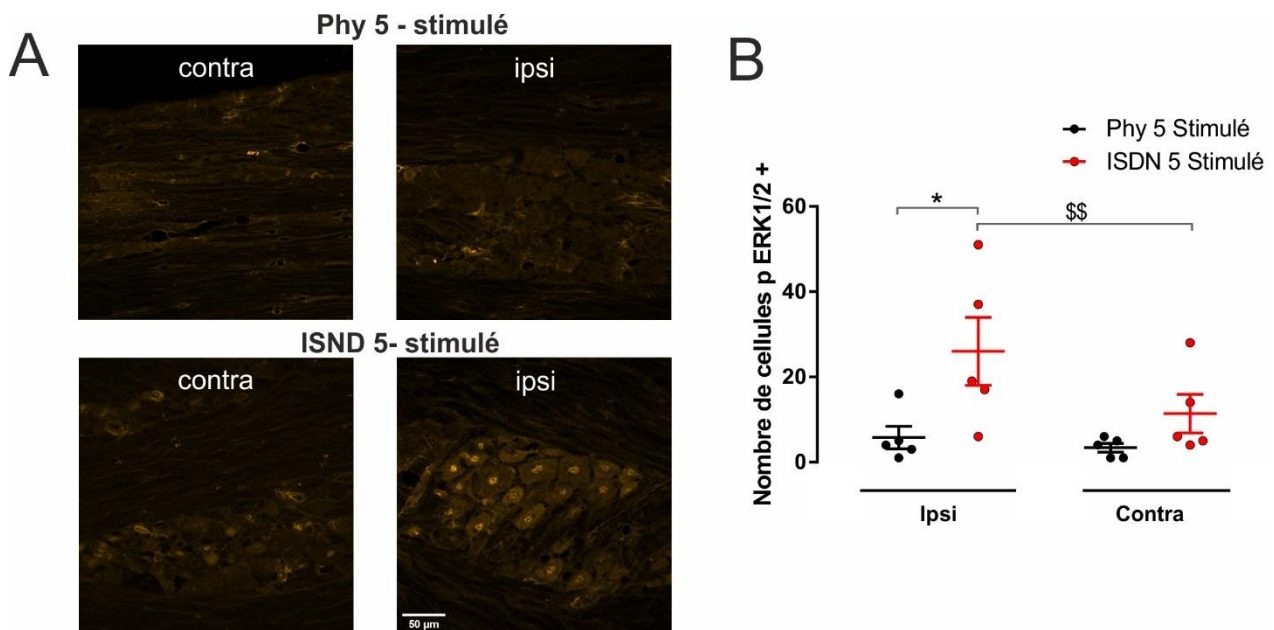


Figure 25 : Effet de la répétition des injections i.p (1 injection / jour /5 jours) d'ISDN (10mg/kg) sur l'expression de p-ERK1/2 au niveau du ganglion trigéminal.

(A) Photomicrographies représentative de l'immuno-réactivité p-ERK mesurée 1h après la dernière injection de sérum physiologique (Phy5) ou d'ISDN (ISDN5). Tous les animaux ont été stimulés via une stimulation mécanique statique réalisée avec un filament de von Frey (6 g) dans la zone périorbitale (V1) à 1Hz pendant 1 minute. (B) Nombre de cellules immuno-réactives pour p-ERK au niveau du ganglion. Moyenne \pm SEM, Anova à deux voies en mesures répétées suivie du test de Sidak, *p= 0,018, \$\$ p=0,0045, n=5 par groupe

II. Approche Immunohistochimique

Pour identifier les structures impliquées dans le développement de l'allodynie céphalique, nous avons utilisé un marqueur d'activation cellulaire à savoir la protéine ERK sous sa forme phosphorylée (p-ERK). Ainsi, nous avons analysé l'expression de p-ERK au niveau du ganglion de Gasser, qui contient les corps cellulaires des neurones afférents primaires innervant la sphère céphalique, et au niveau du Sp5C, qui correspond au premier relais central des informations sensorielles provenant de la face et qui contient les neurones de projections vers les structures suprasegmentaires. Le marquage p-ERK a été mesuré chez les animaux ayant reçu 5 injections de sérum physiologique et chez ceux ayant reçu 5 injections d'ISDN. Cinq minutes avant la mise à mort de l'animal et prélèvement des tissus, la moitié des animaux ont reçu une stimulation mécanique au niveau de la zone ophtalmique à l'aide d'un filament de von Frey de 6g pendant 3 minutes à 1Hz. La comparaison entre les groupes a permis d'évaluer les effets des traitements ISDN et stimulation mécanique (groupes ISDN vs sérum physiologique, groupes « Stimulé » vs « Non stimulé »).

A. Expression de p-ERK dans le ganglion de Gasser

Nos résultats ont montré que l'immunoréactivité pour la protéine p-ERK n'a pas été significativement modifiée par le traitement ISDN chronique lui-même. En effet, du côté controlatéral à la stimulation mécanique (Figure 27 (B)) il n'a pas été constaté de différence significative entre le groupe d'animaux contrôle et celui soumis à 5 injections d'ISDN ($3,4 \pm 1,03$ cellules p-ERK+, Phy5 vs $11,4 \pm 4,5$ cellules p-ERK+, ISDN-5, $p=0,44$, $n=5$ par groupe) même si on peut noter une tendance à l'augmentation pour le groupe ISDN. Du coté ipsilatéral, la stimulation mécanique a entraîné une augmentation significative du nombre de cellules exprimant la protéine p-ERK chez les animaux ISDN 5 injections par rapport au groupe Phy 5 ($p=0,0045$) et par rapport au coté controlatéral ($5,8 \pm 2,63$ cellules p-ERK+ vs $26,0 \pm 7,99$ cellules p-ERK+; $p=0,018$, $n= 5$ par groupe). Ce résultat montre que le traitement ISDN chronique est capable d'augmenter la réponse cellulaire ganglionnaire à une stimulation mécanique faciale.

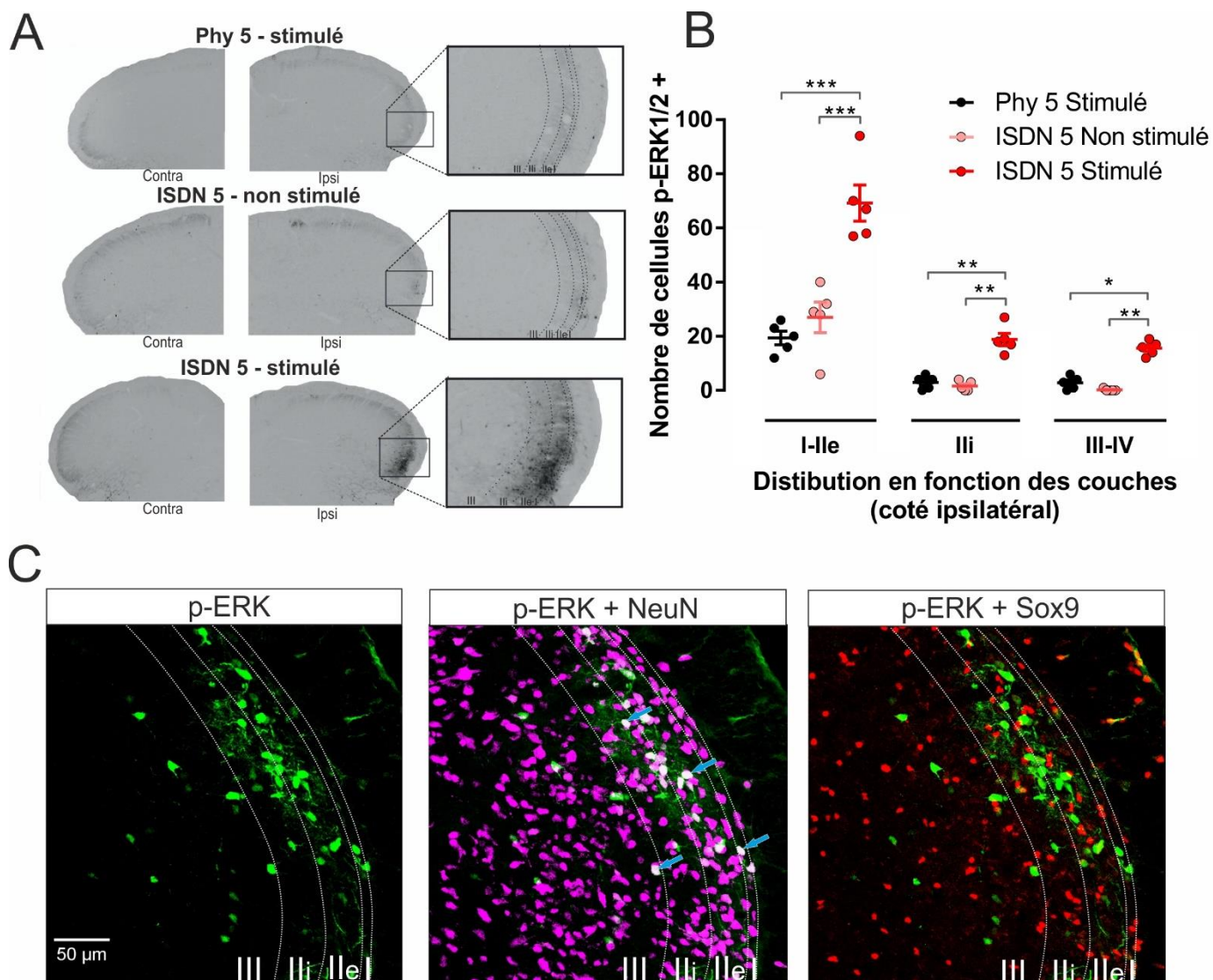


Figure 26 : Effet de la répétition des injections i.p (1 injection / jour / 5 jours) d'ISDN (10mg/kg) sur l'expression de p-ERK1/2 au niveau du Sp5C.

(A) Photomicrographies de l'immuno-réactivité p-ERK, montrant un marquage augmenté dans les couches superficielles de la partie V1 ophtalmique du Sp5C en condition ISDN5 avec stimulation. (B) Mesures du nombre de cellules immuno-réactives pour p-ERK au niveau des différentes couches (I-Ile ; Iii ou III-IV). (Moyenne \pm SEM, Anova à deux voies suivie du test de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 5$) (C) Co-localisation de la protéine p-ERK avec un marqueur neuronal (NeuN) ou un marqueur astrocytaire (Sox9) afin d'identifier le type cellulaire exprimant p-ERK. La photo est celle du Sp5C d'un rat du groupe ISDN 5 injections stimulé. Les flèches pleines bleues indiquent une co-localisation (blanc) entre p-ERK et Neun dans les différentes couches du Sp5C.

B. Expression de p-ERK dans le Sp5C

Comme dans le ganglion, l'immunoréactivité p-ERK au niveau du Sp5C n'était pas modifiée par le traitement ISDN chronique. En effet, nous n'avons pas relevé de différence significative entre le groupe ayant reçu 5 injections de sérum physiologique et celui ayant reçu 5 injections d'ISDN (Figure 28 (B)). Par contre, suite à la stimulation mécanique, nous avons constaté une augmentation significative du nombre de cellules p-ERK+ dans l'ensemble des couches du Sp5C mais surtout dans les couches superficielles I-IIe (ANOVA à 2 voies, test post Hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=5$ par groupe). Ce résultat suggère qu'au niveau du Sp5C, le traitement ISDN répété entraîne une sensibilisation et non une activation directe des cellules du Sp5C, et plus particulièrement au niveau des couches superficielles qui ont un rôle clef dans la transmission des messages nociceptifs.

Pour savoir quel type cellulaire du Sp5C exprimait p-ERK, nous avons réalisé un co-marquage par immunofluorescence de p-ERK associé à deux autres marqueurs chez un animal ISDN-5 stimulé, soit la condition entraînant une surexpression de p-ERK. Nous avons marqué la protéine NeuN, qui marque le corps cellulaire des neurones, et la protéine Sox9, qui est un facteur de transcription exprimé spécifiquement au niveau du noyau des astrocytes chez l'adulte (Sun et al., 2017a). Nos résultats montrent (Figure 28 (C)) que le marquage p-ERK co-localisait uniquement avec NeuN au niveau du Sp5C. En revanche, très peu de cellules p-ERK+ co-exprimaient Sox9. Ces dernières se retrouvaient dans le tract trigéminal et non dans le Sp5C. Les cellules exprimant la protéine p-ERK à la suite de la stimulation mécanique en condition ISDN chronique sont donc des neurones. Les astrocytes, s'ils sont activés, n'expriment pas ce marqueur.

Après avoir vu en comportement le développement d'une allodynie céphalique persistante à la suite du traitement ISDN-5, les résultats de l'approche immunohistochimique ont donc montré au niveau du ganglion trigéminal et du Sp5C une sensibilisation des neurones suggérés par l'augmentation du marquage p-ERK en réponse à une stimulation. Nous allons à présent via une approche électrophysiologique caractériser cette sensibilisation neuronale en enregistrant les neurones WDR du Sp5C via une approche d'enregistrements extracellulaires unitaires *in vivo* chez l'animal anesthésié.

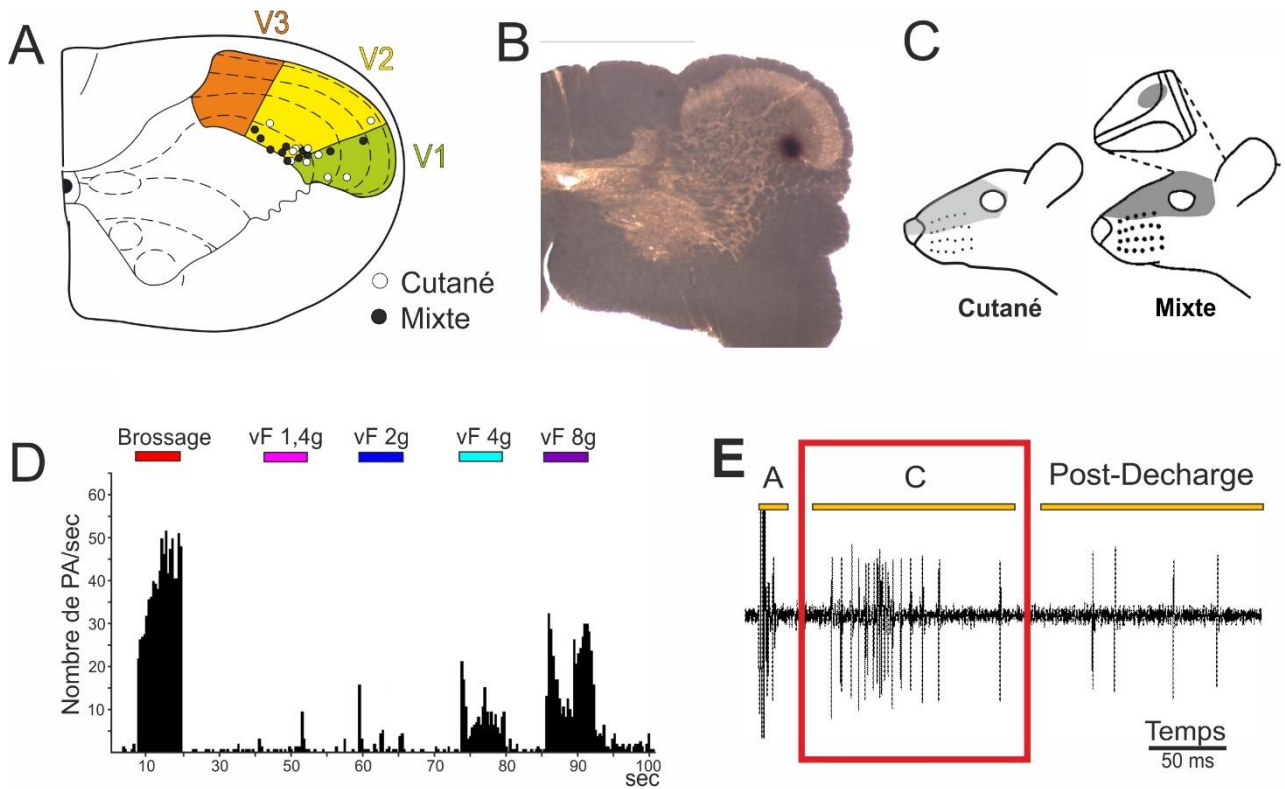


Figure 27 : Caractéristiques générales des neurones nociceptifs enregistrés.

(A) Localisation de 22 neurones répartis dans les zones V2 et V1 du Sp5C dont une grande majorité dans les couches profondes (couche V en particulier), cellules à champ récepteur cutané (point blancs) ou mixte (points noirs). (B) Exemple de photomicrographie d'une coupe de Sp5C avec marquage par un point bleu de pontamine permettant de visualiser le site d'enregistrement. (C) représentation de champs récepteurs types, cutané et mixte. (D) Réponse sous forme d'histogramme de fréquence de PA caractéristique d'un neurone WDR à des stimulations mécaniques dynamiques (brossage) ou statiques (von Frey 1.4g à 8g pendant 10 sec). (E) Exemple représentatif de la réponse d'un neurone WDR à une stimulation électrique de son champ récepteur cutané montrant les réponses à courtes (type A) et longues (type C) latences et la post-décharge. Nous allons nous focaliser sur la réponse C dans notre étude (cadre rouge)

III. Approche Electrophysiologique

A. Localisation des neurones enregistrés

Nous avons réalisé nos enregistrements électrophysiologiques dans 2 groupes de rats différents : un groupe d'animaux Naïfs, qui servira de contrôle basal et un groupe ISDN chronique pour évaluer l'effet de la répétition des injections d'ISDN. Nous avons testé la réponse basale entre les 2 conditions. Les animaux ont reçu ensuite une injection d'ISDN (i.v) pendant l'enregistrement de l'activité neuronale. Les animaux Naïfs permettront d'évaluer l'effet d'ISDN-1, les animaux chroniques l'effet d'ISDN-5.

Les neurones que nous avons enregistrés pour cette étude étaient localisés dans les couches profondes du Sp5C, mis à part pour 2 neurones situées dans les couches plus superficielles, au niveau des aires V1 et V2. La localisation de 22 neurones a été représentée Figure 29 (A), ainsi qu'un exemple représentatif d'un site d'enregistrement localisé par un point au bleu de pontamine (B).

Les cellules enregistrées ont des champs récepteurs ophtalmiques (V1) ou ophtalmiques + maxillaires (V1-V2), situés autour de l'œil (Figure 29 (C)). Les neurones « Cutanés » ne reçoivent pas d'afférence des méninges alors que les cellules « Mixtes » reçoivent à la fois des champs récepteurs de la peau et des méninges. Les champs récepteurs des animaux Naïfs était plus petits et restreints à un seul territoire, alors que les animaux ISDN chroniques présentaient des champs récepteurs beaucoup plus large et s'étendant à plusieurs territoires.

B. Nature des neurones enregistrés

Les neurones que nous avons enregistrés répondaient tous aux critères des neurones nociceptifs dits « à convergence » ou « WDR ». En effet, ils présentaient une réponse aux stimulations tactiles dynamiques (brossage) et statiques (von Frey). Ils étaient capables de coder l'intensité des stimulations (Figure 29(C)), et leurs réponses aux stimulations électriques de leurs champs récepteurs cutanés montraient une réponse à courte latence liée à la mise en jeu des fibres de type A ($A\beta$ et $A\delta$) et une réponse à longue latence due à la mise en jeu des fibres C ($10,05 \pm 0,146$ ms pour $A\delta$ et $69,43 \pm 1,58$ ms pour les fibres C).

Naïf				ISDN chronique			
Neurone cutané (n=15)		Neurone mixte (n=7)		Neurone cutané (n=37)		Neurone mixte (n=23)	
A δ	C	A δ	C	A δ	C	A δ	C
0,93 \pm 0,13	3,90 \pm 0,53	0,58 \pm 0,05	2,04 \pm 0,37	0,65 \pm 0,06	3,61 \pm 0,53	0,51 \pm 0,08	1,99 \pm 0,18**
		A δ	C			A δ	C
		1,16 \pm 0,28	3,27 \pm 0,67			1,29 \pm 0,19	2,49 \pm 0,28

Tableau 5 : Récapitulatif des seuils (en mA) de déclenchement des différents types de fibre en fonction du type de leur champ récepteur (cutané ou mixte) et du traitement (Naïf ou ayant reçu 4 injections d'ISDN). Pour les cellules mixtes, le seuil de déclenchement des réponses aux stimulations du territoire méningé est indiqué dans un sous-tableau. Les cellules mixtes des animaux ISDN chronique ont un seuil d'activation des fibres C plus bas que les cutanées (1.99 vs 3.90 mA)

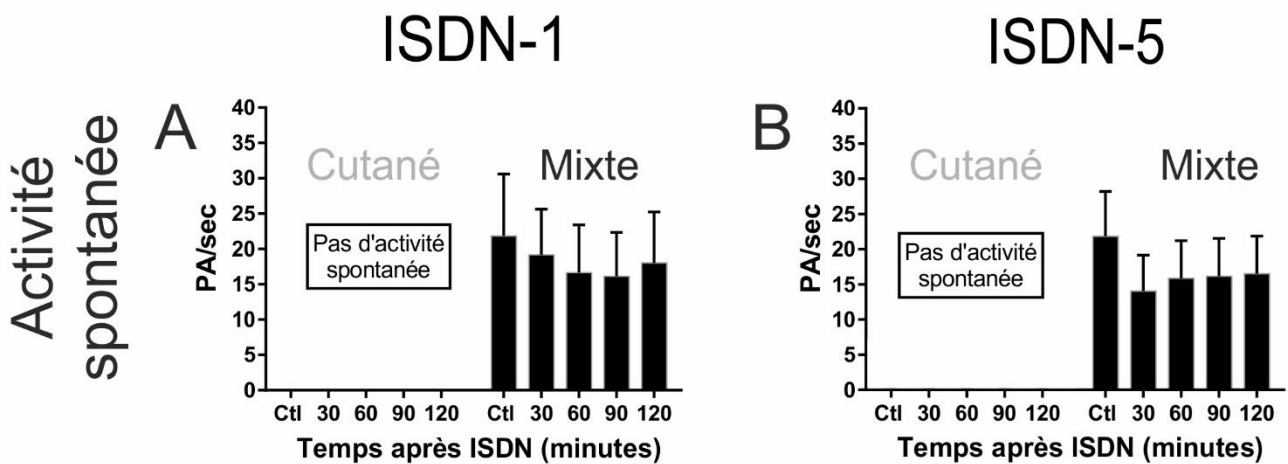


Figure 28 : Effets du traitement ISDN sur l'activité spontanée des neurones WDR du Sp5C.

Les cellules cutanées ne présentent pas d'activité spontanée dans aucune des 2 conditions. Les cellules Mixtes présentent une activité spontanée contrôlée similaire entre la condition Naïve (A) et ISDN chronique (B). L'injection d'ISDN n'a pas entraîné de modification significative de cette activité.

Certains neurones présentaient également une post-décharge à la réponse C. Le seuil de recrutement des différentes fibres sont représentés sur le Tableau 2, en fonction du groupe des animaux et du type de champs récepteur. Notre étude se focalisant sur un état de sensibilisation chronique, le nombre d'animaux Naïf est donc moins important par rapport au groupe ISDN chronique.

L'ensemble des neurones présentait une réponse significativement stable (en nombre de potentiels d'action) au cours des contrôles ainsi que la forme et la taille des potentiels d'actions au cours de tout l'enregistrement. Lors de certains enregistrements, l'injection d'ISDN a entraîné la perte du neurone. Pour ces neurones, les valeurs contrôles ont été incluses dans l'étude afin de comparer les caractéristiques basales (seuil de recrutement des fibres) entre les différents groupes.

C. Modification par l'ISDN des propriétés et réponses des neurones WDR

➤ *Seuil d'intensité de déclenchement des réponses*

Les seuils d'intensité de déclenchement des réponses à la stimulation électrique représentés dans le Tableau 5. Comme cela est attendu, nous avons montré une intensité nécessaire pour évoquer les réponses C significativement supérieure à celle requise pour les réponses A δ que ce soit à partir de la peau ou des méninges. Le seuil pour les réponses déclenchées par la stimulation au niveau du territoire cutané était significativement différent entre les cellules cutanées et les cellules mixtes ($3,61 \pm 0,53$ mA vs $1,99 \pm 0,18$ mA, $p=0,007^{**}$) dans le groupe ISDN. On retrouve une telle différence pour le groupe Naïf ($3,90 \pm 0,53$ mA vs $2,04 \pm 0,37$ mA, $p= 0,091$) mais qui n'est pas significative (faible valeur du $n=7$). Enfin nos résultats n'ont pas montré de différence significative entre les valeurs des seuils des animaux Naïf et ceux ISDN chronique. Ce résultat suggèrerait que l'injection répétée d'ISDN n'entraîne pas de sensibilisation périphérique persistante.

➤ *Activité spontanée*

L'activité spontanée, quand elle était présente, a été quantifiée durant les contrôles pour tous les neurones enregistrés, puis à différents temps après l'injection d'ISDN. Les neurones cutanés, peu importe le groupe (Naïf ou ISDN chronique) ne présentaient pas d'activité spontanée significative. Après injection d'ISDN, il n'y a pas eu d'apparition d'activité

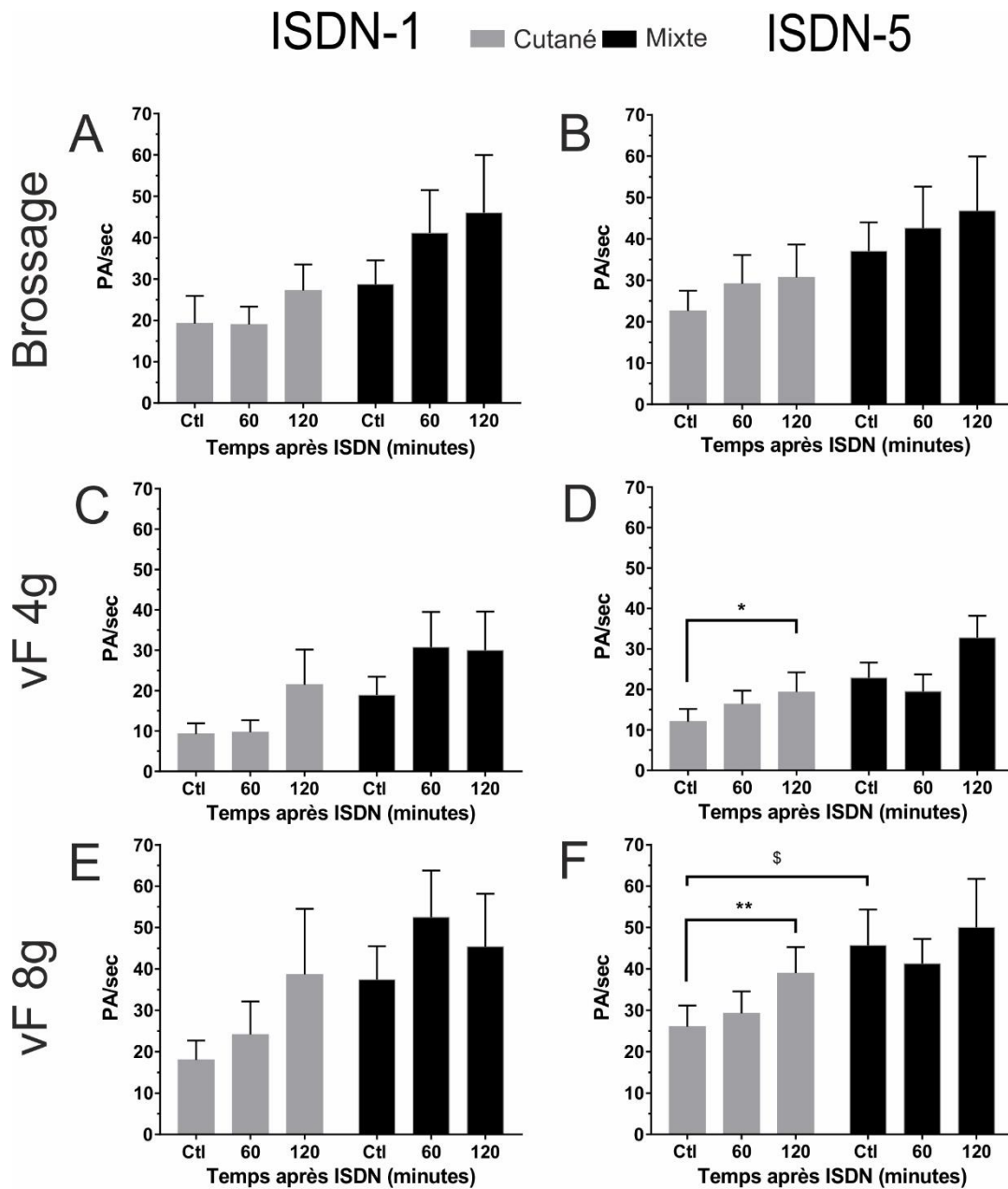


Figure 29 : Réponse aux stimulations mécaniques des neurones WDR.

Les mesures ont été effectuées 60 et 120 min après l'injection unique (ISDN-1, A,C,E) ou la 5ème injection (à J5, ISDN-5, B,D,F) sur les réponses aux stimulations mécaniques dynamiques (brossage, A,B) et statiques (filaments de von Frey 4 et 8g, C,D,E et F respectivement). * p = 0,0249, **p=0,0056 ; comparaison avec Ctl, §§p = 0,0377, comparaison entre les types de cellules.

spontanée pour aucun des neurones enregistrés. Les cellules recevant des afférences méningées montraient une activité spontanée significativement plus importante par rapport aux cellules cutanées, aussi bien dans le groupe ISDN-1 que dans le groupe ISDN-5. Lorsqu'on compare l'activité spontanée basale entre ces 2 groupes, il n'y a pas différence significative ($21.85 \pm 8,74$ PA/sec, n=6 pour ISDN-1 vs $21,85 \pm 6,37$ PA/sec ; n=9 pour ISDN-5). L'injection d'ISDN (1^{ère} ou 5^{ème}) n'entraîne pas de modification de l'activité spontanée des neurones enregistrés (Figure 30 (A) et (B)).

➤ *Réponses à la stimulation mécanique*

Les neurones WDR répondaient à une gamme de stimulations mécaniques dynamiques et statiques de manière proportionnelle à l'intensité des stimulations (Figure 31). Nous avons évalué cette réponse aux stimulations lors des contrôles puis à différents temps après injection d'ISDN (ISDN-1 ou ISDN-5).

- *Stimulation dynamique (Brossage)*

La réponse des cellules aux stimulations dynamiques a été évaluée pour l'ensemble des cellules au niveau de leurs champs cutanés à l'aide d'un pinceau (cf méthode). La valeur moyenne de la fréquence de décharge des neurones en réponse à la stimulation mécanique a été calculée en nombre de potentiels d'action par seconde. Nos résultats ne montraient pas de différence significative entre la réponse au brossage des animaux Naïfs et celle des animaux ISDN chronique, ni pour les cellules cutanées (histogrammes gris, $19,25 \pm 6,67$ PA/sec vs $22,59 \pm 4,89$ PA/sec pour les cellules cutané, Naïf n= 6 et ISDN chronique n= 11 respectivement) ni pour les cellules mixtes (histogrammes noirs, $28,69 \pm 5,81$ PA/sec vs $37,11 \pm 6,9$ PA/sec pour les cellules mixtes, Naïf n= 6 ; ISDN chronique n= 8 respectivement, Figure 31 (C) et (D)).

Nous avons suivi l'évolution de cette réponse soit après une injection unique d'ISDN (ISDN-1 condition aigue) soit après la 5^{ème} injection d'ISDN (ISDN-5 condition chronique). Cette réponse a été évaluée toutes les 10 minutes mais pour plus de clarté les résultats ne sont présentés que dans la condition 1h post-injection (qui correspond au pic d'allodynie à la fois pour ISDN-1 et ISDN-5 mesuré lors de l'approche comportementale) et à 2h post-injection (qui correspond à la fin du suivi électrophysiologique).

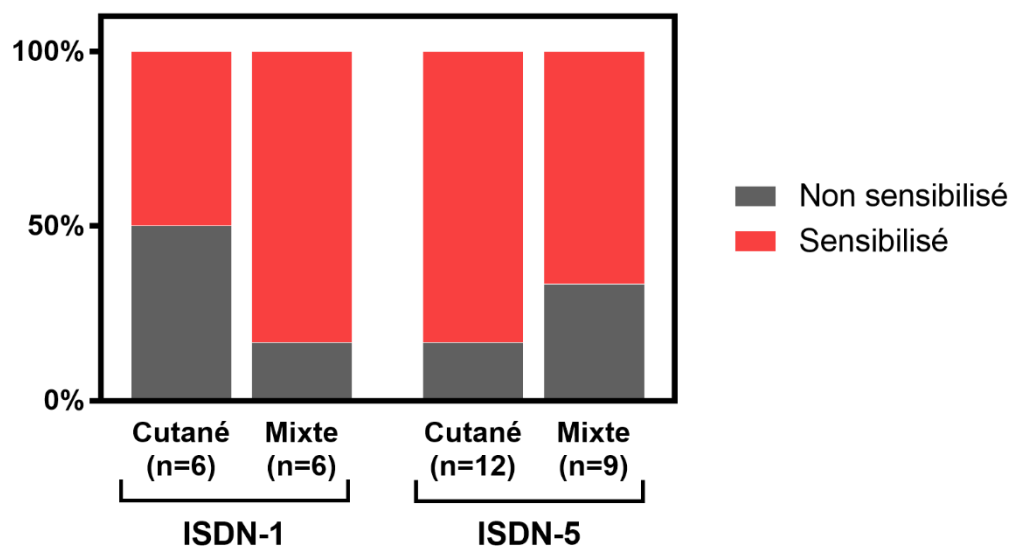


Figure 30 : Proportion de neurones sensibilisés en fonction du traitement et du type de cellule.à champ cutané ou mixte.

- Stimulation statique (filament de von Frey)

L'application cutanée des filaments de von Frey selon une gamme couvrant des valeurs de stimulations aussi bien non-nociceptives que nociceptives a été réalisée de manière non linéaire (up and down). Seuls les résultats obtenus avec le vF 4g (seuil de la plupart des cellules enregistré) et le vF 8g (nociceptif) sont présentés sur la Figure 31 en C,D et E,F. La réponse aux vF 1,4g et 2g ne montrait pas de différence en fonction des conditions. Toutes les valeurs sont exprimées en fréquence de décharge pendant la stimulation (PA/sec). Pour commencer, il n'y a pas de différence dans la réponse basale au vF 4g entre les différents types de cellules et/ou traitements.

Les neurones WDR du groupe ISDN-1 répondent au vF 4g : $9,28 \pm 2,62$ PA/sec en contrôle, $21,48 \pm 8,681$ PA/sec 120 minutes après ISDN, pour les cellules cutanées (n=6). La différence n'est pas significative, mais on peut noter une tendance à l'augmentation. Les cellules mixtes du groupe ISDN-1 répondent au vF 4g $18,87 \pm 4,58$ PA/sec en contrôle et ne sont pas modifiées après injection d'ISDN.

Pour le groupe ISDN-5, les cellules cutanées répondent au vF 4g $12,06 \pm 3,118$ PA/sec en contrôle et $19,38 \pm 4,844$ PA/sec 120 minutes après ISDN. La réponse au vF 4g est augmentée de manière significative 120 minutes après ISDN ($p=0,025$, n=11, Anova une voie mesure répétées suivis du test de Dunnett). Les cellules mixtes du groupe ISDN-5 (n=8) répondent au vF 4g : $22,87 \pm 3,78$ PA/sec durant les contrôles et cette réponse ne change pas après injection d'ISDN.

Finalement, nous avons évalué la réponse au vF 8g, soit une stimulation nociceptive, dans nos différentes conditions expérimentales. Pour le groupe ISDN-1, la réponse moyenne des neurones cutanés était de $18,03 \pm 4,67$ PA/sec durant les contrôles ; $24,15 \pm 8,01$ PA/sec 60 minutes après ISDN et $38,68 \pm 15,85$ PA/sec 120 minutes après ISDN. Nous avons une tendance à la hausse marquée entre la valeur contrôle et 120 minutes après ISDN, mais qui n'est pas significative (* $p= 0,233$, n=6). Pour les cellules mixtes, leur réponse était de $37,4 \pm 8,09$ PA/sec ; $52,45 \pm 11,31$ PA/sec ; $45,38 \pm 12,79$ PA/sec en contrôle, 60 minute et 120 minutes après ISDN (n=6).

Pour le groupe ISDN-5, la réponse moyenne des neurones cutanés au vF 8g était de $26,02 \pm 5,13$ PA/sec durant les contrôles ; $29,27 \pm 5,28$ PA/sec 60 minutes après ISDN et $38,95 \pm 15,85$ PA/sec 120 minutes après ISDN. Il y a ainsi une augmentation significative de la réponse

ISDN-1

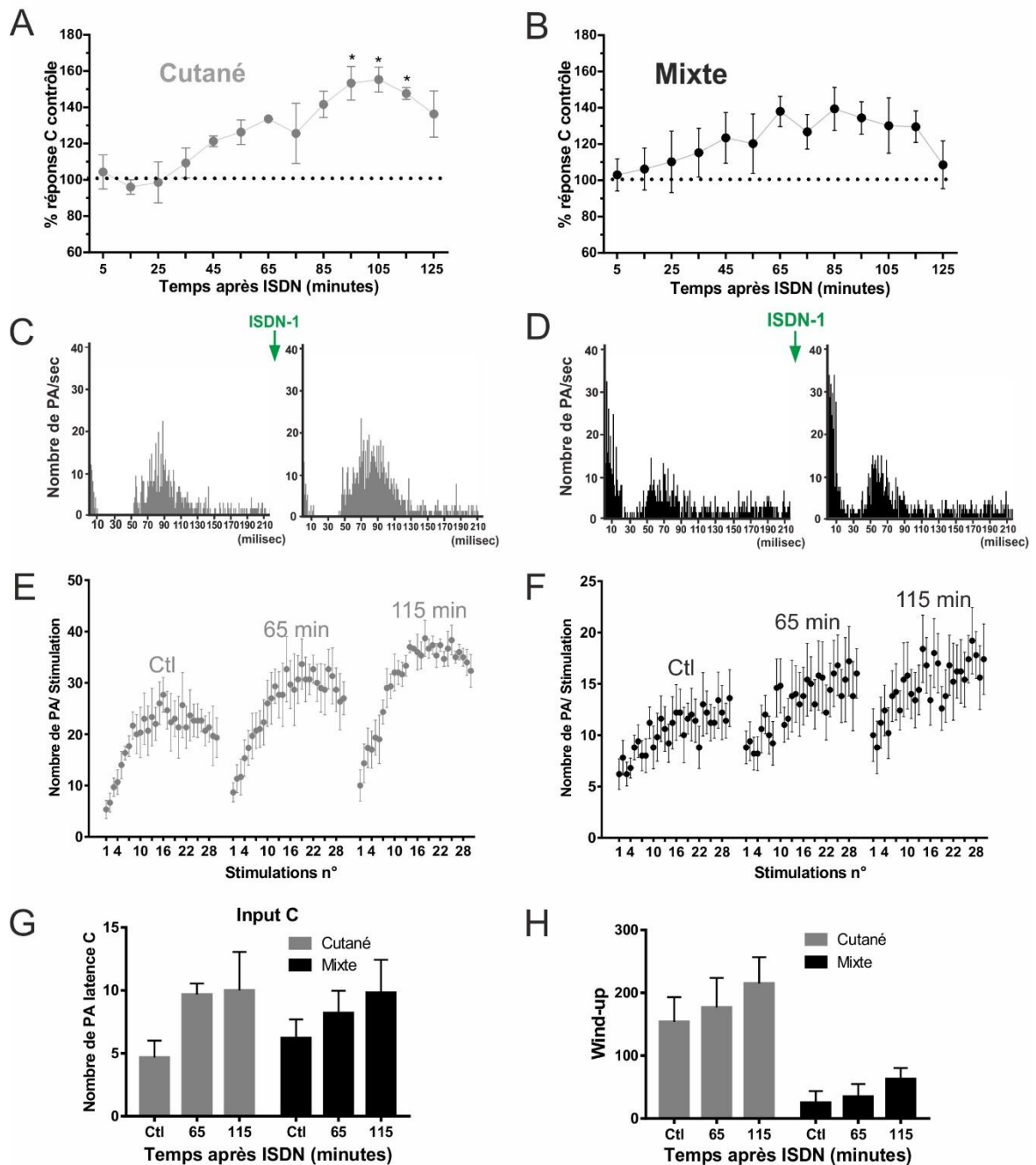


Figure 31 : Effets du traitement ISDN-1 en fonction du type de champ récepteur (cutané ou mixte)
 A, B : valeurs de la réponse C (en % du contrôle) au cours du temps montrant une augmentation significative ($*p < 0.05$) à partir de 95 minutes (cutané) post injection. C, D : exemples individuels de PSH (sur 30 stimulations) montrant la réponse C enregistrée avant et 95 minutes après l'injection injection respectivement. E, F : Réponse moyenne (\pm SEM) du nombre de PA aux latence C au fur et à mesure des 30 stimulations (0.66 Hz) mesurée avant (ctl), 65min et 115 min après injection d'ISDN. G, mesure de l'input C (nb de PA évoqués par la première stimulation électrique). H : valeurs du wind-up montrant la différence entre neurones à champ cutané et ceux à champ mixte entre le contrôle, 65 et 115 minutes après ISDN-1. NB, le traitement ISDN 1 ne modifie ni l'input C ni le wind-up de manière significative.

au vF 8g induite par l'injection d'ISDN après 120 min (**p=0,0056, n=11). Pour les cellules mixtes, leur réponse était de $45,68 \pm 7,13$ PA/sec durant les contrôles, et cette réponse reste inchangée après ISDN. Il n'y a pas de différence dans la réponse au vF nociceptif après injection d'ISDN, par contre si on compare la réponse basale des neurones cutané et mixte du groupe ISDN-5, les cellules méningées ont une réponse significativement plus importante ($26,02 \pm 5,13$ PA/sec vs $45,68 \pm 7,13$ PA/sec, $\$p=0,037$, n=11 et n=8).

➤ Réponses à la stimulation électrique

- Réponse globale

Le nombre total de potentiel d'actions évoqués entre 30 et 200 ms (après le début de la stimulation électrique du champ récepteur) par la série de 30 stimulations électriques a été compté afin de déterminer la réponse du neurone dû à la mise en jeu des fibres C. Elle a été considérée comme la « Réponse C ». Les réponses évoquées par les fibres C ont été normalisées par rapport au niveau de référence, c'est-à-dire les deux séquences de contrôle réalisées en début d'enregistrement. Un neurone est classé comme « sensibilisé » lorsque la réponse est $\geq 120\%$ du niveau de référence pour moins 2 points consécutifs (Flores Ramos et al., 2017). Le critère retenu pour la potentialisation des réponses neuronales correspond à plus de quatre fois l'écart type moyen des séquences stables successives - c'est-à-dire une variation de la réponse de la fibre C $<10\%$.

Dans le groupe ISDN-1, 50% des neurones cutanés testés (3 sur 6) ont été sensibilisés à la suite de l'injection unique d'ISDN. Pour les cellules mixtes ; 5 cellules sur 6 soit 83 % des cellules méningées ont été sensibilisées par l'injection d'ISDN. Il y a donc un effet préférentiel de la « première » injection d'ISDN sur les cellules mixtes (Figure 32). Sur la Figure 33 (C) et (D) nous pouvons voir un exemple de réponse d'un neurone cutané (gris) et mixte (noir) durant les contrôles puis 115 minutes après ISDN, sous la forme de Post-Stimulus Time Histogram (PSTH*).

Dans le groupe ISDN-5, 10 sur 12 neurones WDR cutanés, soit 83% des cellules, ont vu leur réponse C augmentées (sensibilisées) après l'injection d'ISDN (5^{ème}). Pour les cellules mixtes, 67% des cellules (6 sur 9) ont été sensibilisées (Figure 32). Ainsi, en termes de population, l'ISDN influence de façon plus importante les cellules cutanées après la 5^{ème} injection d'ISDN qu'après la 1^{ère}. De la même manière, sur la Figure 33 (C) et (D), sont

ISDN-5

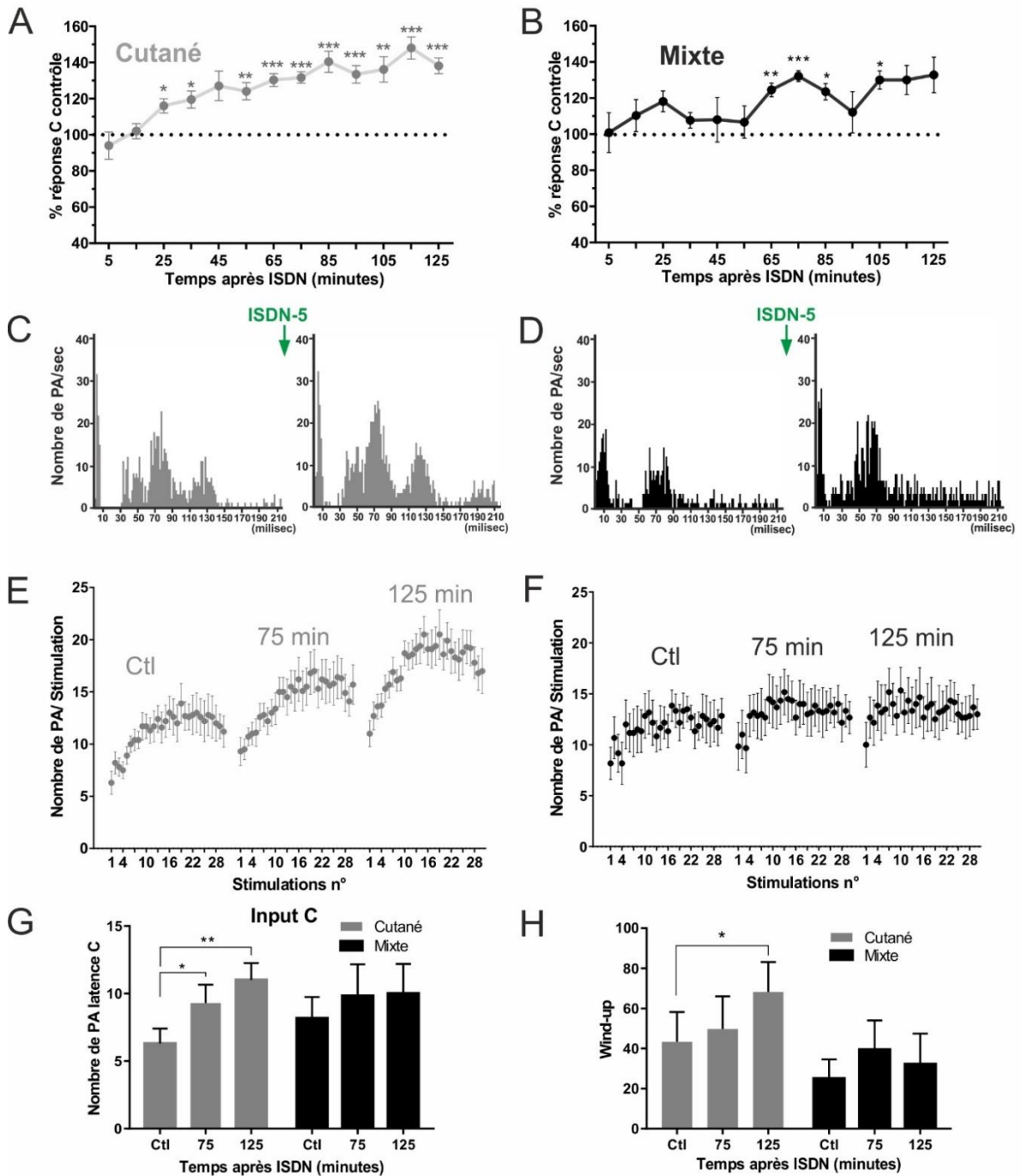


Figure 32 : Effets du traitement ISDN-5 en fonction du type de champ récepteur (cutané ou mixte)

A, B : valeurs de la réponse C (en % du contrôle) au cours du temps montrant une augmentation significative ($*p < 0.05$) à partir de 25 min (neurones cutanés) ou 65 min (neurones mixtes) post injection. C, D : exemples individuels de PSTH (sur 30 stimulations) montrant la réponse C enregistrée avant et 120 minutes après la 5ème injection d'ISDN, respectivement. E, F : Amplification (wind-up) de la réponse C au fur et à mesure des 30 stimulations (0.66 Hz) mesurée avant (ctl), 75 min et 125 min après injection d'ISDN. G, Augmentation significative de l'input C après ISDN-5. H : augmentation du wind-up après ISDN ; NB, seuls les WDR à champs cutané voient l'input C et le wind-up augmenter de manière significative après ISDN 5.

représentés sous forme de PSTH la réponse d'un neurone cutané (gris) et mixte (noir) durant les contrôles puis 125 minutes après ISDN.

Le décours temporel de l'effet d'ISDN-1 est décrit sur la Figure 33 (A) et (B), et celui de la 5^{ème} injection d'ISDN en Figure 34 (A) et (B). Nous pouvons voir que pour le groupe ISDN-1, la sensibilisation des neurones cutanés est significative à partir de 85 minutes après ISDN ($141,7 \pm 7,17$ % contrôles, $p=0,0132$, $n=3$) jusqu'à 105 minutes post ISDN ($155,3 \pm 6,89$ % contrôles, $p=0,0435$). Pour les cellules Mixtes, la réponse des cellules sensibilisées (5 sur 6) étant variable en fonction des cellules, la valeur moyenne de leur réponse ne permet pas de mettre en évidence un effet de l'ISDN. En effet, pour 2 cellules sur 5, la réponse C a augmenté rapidement au cours des 40 premières minutes, puis la réponse a diminué pour revenir à un niveau proche des contrôles alors que pour les 3 autres cellules, la sensibilisation était plus tardive (80 minutes post-ISDN).

Dans le groupe ISDN-5, la sensibilisation des cellules cutanées est significative à partir de 25 minutes ($116 \pm 3,9$ % des contrôles, $p=0,023$, $n=10$) et a continué à augmenter jusqu'à la fin de l'enregistrement, 125 minutes post-ISDN ($138,2 \pm 4,37$ % des contrôles, $p<0,001$).

Nous pouvons voir sur les Figure 33 et 34 en E et F la réponse moyenne C (\pm SEM) des neurones WDR au cours des 30 stimulations (2 fois le seuil des fibres C, 0,66 Hz). La réponse au cours des stimulations répétées n'est pas linéaire, mais elle va être amplifiée (jusqu'à la stimulation 15 environ). Elle va atteindre un plateau, voire redescendre sur les dernières stimulations. Cette phase d'amplification est appelée « wind-up », provoquée par la répétition d'une stimulation à intensité constante et fréquence dépendante (sommation temporelle) (Coste et al., 2008). Cette sensibilisation est dite à court terme car l'amplification est surtout visible durant les 15 premières réponses sur la série de 30 stimulations électriques du champ récepteur.

L'entrée C ou « input C » constitue le nombre de potentiels d'action émis par le neurone WDR lors de la première stimulation électrique (train de 30 stimulations), c'est-à-dire une réponse non conditionnée. Effectivement, les phénomènes de plasticité tels que l'activation des canaux NMDA nécessite un conditionnement pour pouvoir être activés (par exemple une dépolarisation de la membrane pour libérer les ions Mg^{2+} qui bloquent le canal Ca^{2+}). Cet input C est considéré comme le reflet de la « quantité » de fibres afférentes primaires activées.

- Input C

Après une injection unique d'ISDN (ISDN 1), il n'y a pas de modification significative de l'input C que ce soit dans le cas des cellules cutanées ($4,67 \pm 1,33$ PA contrôle, $10 \pm 3,05$ PA 115 minutes post-ISDN, n=3) ou des cellules mixtes ($6,2 \pm 1,49$ PA contrôle, $9,8 \pm 2,63$ PA 115 minutes post-ISDN, n=5) (Figure 33 E). Cependant on peut noter pour les 2 types de cellules une tendance à l'augmentation, qui n'est pas significative dû au faible nombre de cellules sensibilisées (n = 3 et n=5 respectivement)

L'analyse de l'évolution de l'input C après ISDN-5 a montré que l'input C augmentait significativement dès 75 minutes pour les cellules cutanées ($6,30 \pm 1,10$ PA pendant les contrôles ; $9,30 \pm 1,7$ PA 75 minutes après ISDN, Figure 34 (G)) pour se stabiliser à $11 \pm 1,25$ PA 125 minutes après ISDN (p= 0,030 et p= 0,0019, n=10).

Pour les cellules mixtes, nous n'avons pas observé de modification significative mais une tendance à l'augmentation ($8,17 \pm 1,57$ PA contrôle, $10 \pm 2,19$ PA 125 minutes post-ISDN, n=6).

- Wind-up de la réponse C

Sur les Figures 33 et 34 en (C) et (D), sont représentés les nombres moyens (\pm SEM) de potentiels d'action C (30-200 ms) évoqués à chacune des stimulations électriques du train de 30 stimulations électriques. Le wind-up, que l'on peut apprécier en évaluant la pente des courbes, est surtout visible pour les cellules cutanées ; entre la stimulation 1 et 15. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la phase entre la 1^{ère} et la 15^{ème} stimulation électrique et le wind up a été calculé d'après la formule suivante. (Chapman et al., 1998; Dickenson et al., 1997):

$$\text{(Somme de la réponse aux 15 premières stimulations)} - \text{Input C} \times 15$$

Nous pouvons noter que les cellules cutanées présentent un wind up plus important par rapport aux cellules mixtes, et ce chez les animaux ISDN-1 ou ISDN-5.

Les résultats montrent qu'une seule injection d'ISDN (ISDN-1) n'a pas modifié significativement le wind-up des cellules cutanées testées ($153,8 \pm 39,35$ vs $214,8 \pm 41,83$, p=0,527). Cependant un nombre de cellules sensibilisées plus important serait nécessaire afin de mieux caractériser l'effet de l'ISDN-1. Pour les cellules mixtes, la wind-up est resté stable au cours des enregistrements.

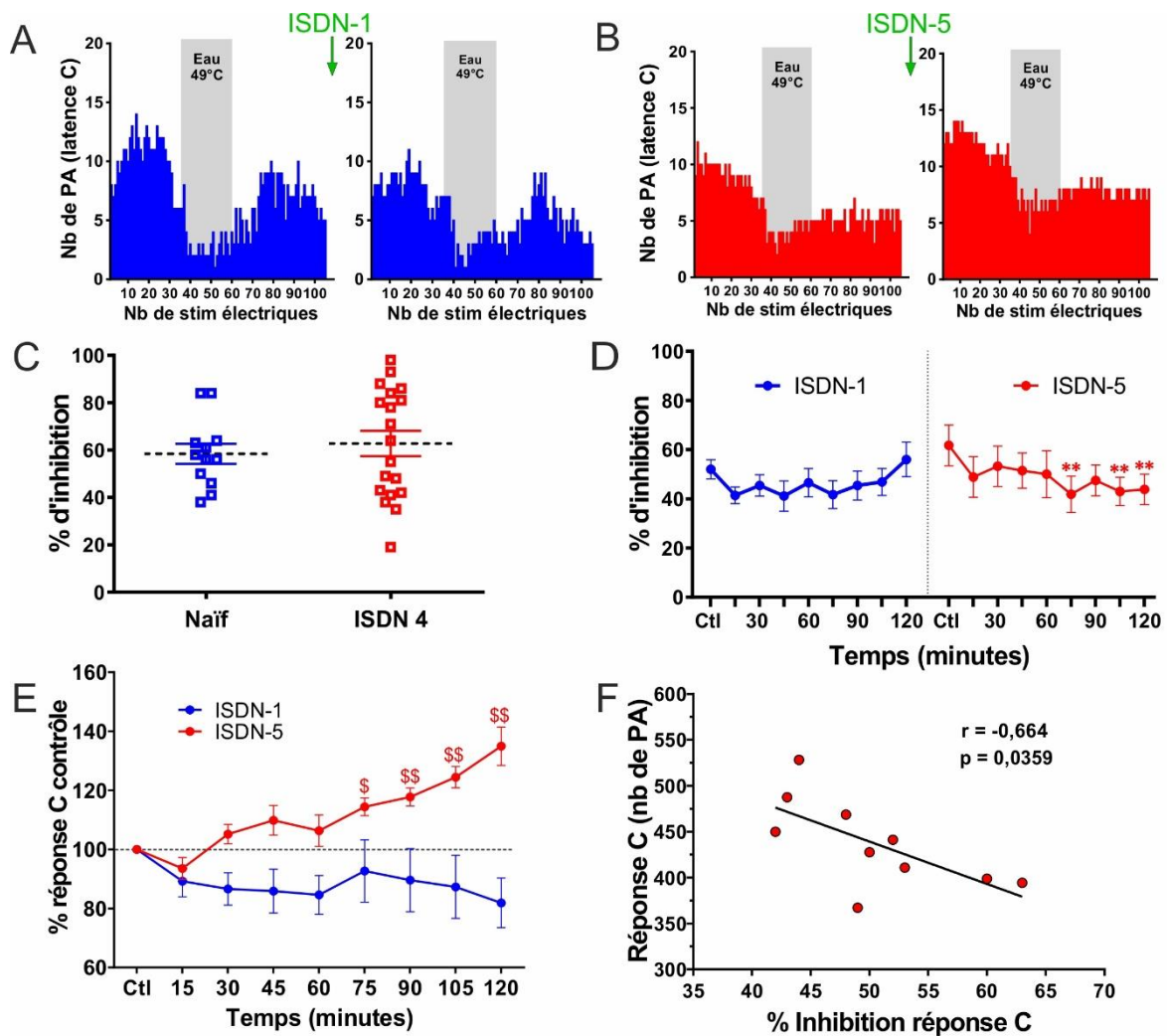


Figure 33 Effets de l'injection d'ISDN en condition aiguë (1 injection ISDN1) ou répétée (5 injections, ISDN 5) sur le pourcentage d'inhibition de la réponse C des neurones WDR du Sp5C induite lors des CIDN (stimulation nociceptive hétérotopique, patte postérieure plongée dans un bain d'eau à 49°C)

A et B, exemples individuels de l'évolution du nombre de réponses C au cours de séries de 105 stimulations électriques du champ cutané facial avec application du bain d'eau à 49°C de la 36ème à la 60ème stimulation (cf matériel et méthodes). C : pourcentage d'inhibition de la réponse C mesurée en condition sans injection (Naïf) et après 4 injections d'ISDN (avant la 5^{ème}, ISDN 4). D : Evolution du pourcentage d'inhibition de la réponse C après 1 injection (ISDN1) ou 5 injections (ISDN 5). E : variations de la réponse C (mesurée durant les 30 premières stimulations) au cours du protocole avec succession de séries CIDN (105 stimulations). F : corrélation entre la variation du pourcentage d'inhibition (CIDN) et celle de la réponse C (en % du contrôle) analysée 45 min après la 5^{ème} injection. ($r=-0,66$, $p = 0,035^*$)

En condition chronique, la 5^{ème} injection d'ISDN a provoqué une augmentation du wind-up des cellules cutanées (Figure 34.) : à 125 minutes sa valeur était de $43,35 \pm 14,84$ avant injection et de $68,25 \pm 14,9$ après ISDN, $n = 10$, $p = 0,0347$). Pour les cellules mixtes, nous n'avons pas observé de modification significative du wind-up (Figure 34 (H)) à 75 et 125 min post-injection.

IV. Contrôles inhibiteurs diffus induits par nociception

Les neurones WDR sont sensibles à l'action des Contrôles Inhibiteurs Diffus induits par nociception (CIDN) qui constituent un puissant moyen expérimental de mettre en jeu les contrôles descendants inhibiteurs. Ils peuvent être activés via une stimulation nociceptive hétérotopique comme la patte arrière de l'animal, droite ou gauche en alternance, plongée dans un bain d'eau à 49°C (Figure 35 A et B). Nous avons testé l'efficacité des CIDN sur la réponse des neurones WDR cutanés, en effectuant des séries de 105 stimulations électriques pendant lesquelles la patte arrière de l'animal est plongée dans un bain à 49°C (de la stimulation 36 à 60). Les résultats présentés dans la Figure 35. Sur les exemples A et B, nous pouvons voir que l'application de la stimulation thermique au niveau d'une patte postérieure entraîne une inhibition de la réponse C, puis nous avons un retour progressif de la réponse C. Le % d'inhibition est calculé en comparant le nombre de PA émis pendant les stimulations 21 à 35 (Réponse maximale du neurone) par rapport aux nombres de potentiels aux stimulations 46 à 60 (pendant que la stimulation thermique de la patte) (Coste et al., 2008 ; Boyer et al., 2014).

L'inhibition de la réponse C moyenne chez les animaux Naïfs est de $58,42 \pm 4,19$ % ($n=12$), et celle chez les animaux du groupe ISDN chronique est de $62,79 \pm 5,35$ % ($n=19$). Les résultats ne montraient aucune différence significative ($p=0,567$, t-test non apparié) entre les 2 groupes d'animaux. On peut cependant noter une grande variabilité dans l'efficacité des CIDN notamment dans le groupe ISDN visible sur le graphique de la Figure 35 C. L'efficacité des CIDN (% inhibition de la réponse C trigéminal) a été analysée sur des cellules cutanées ($n=8$) à la suite de l'injection d'ISDN (condition aiguë ISDN-1 ou chronique ISDN-5).

Le pourcentage d'inhibition de la réponse C n'était pas significativement modifié après l'injection d'ISDN dans le cas aigu (1 injection). Dans la condition chronique, le pourcentage d'inhibition était de $61,75 \pm 8,28$ % d'inhibition pendant les contrôles. Après injection de

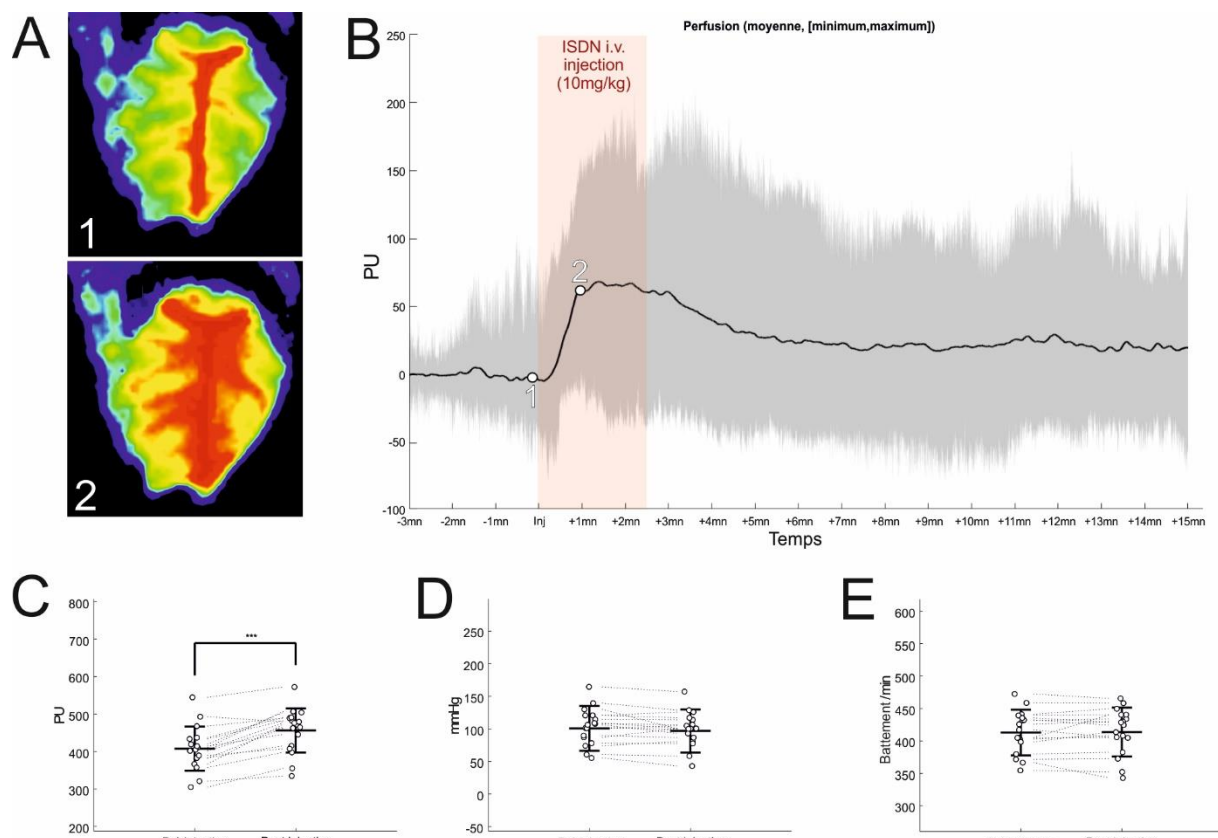


Figure 34 : Effet de l'injection d'ISDN sur la perfusion des méninges.

A : Exemple représentatif de la perfusion des méninges avant (1) et pendant (2) l'injection d'ISDN. B : Variation moyenne de la perfusion des méninges normalisée par rapport à la ligne de base. 1 et 2 indiquent le temps correspondant aux exemples représentés en A. C : Valeurs de la perfusion (PU pour Perfusion Unit) avant/après le début d'injection d'ISDN. (Moyenne +/- SEM : $407,10 \pm 14,26$ PU avant injection vs $456,0 \pm 14,25$ PU après injection, t-test apparié, $p < 0.001$, $n=17$). D : Valeurs de la pression artérielle moyenne avant et pendant injection d'ISDN (moyenne +/- SEM : $100,728 \pm 8,33$ mmHg vs $96,85 \pm 8,02$ mmHg). E : Valeurs de fréquence cardiaque avant et pendant l'injection d'ISDN (moyenne +/- SEM : $412,89 \pm 8,55$ b/min vs $413,79 \pm 9,13$ b/min).

l'ISDN, le % d'inhibition subissait une légère baisse qui apparaissait significative à partir 75 minutes ($41,88 \pm 6,28$ %), à 105 minutes ($43,0 \pm 5,74$ %) et à 120 minutes ($43,88 \pm 6,17$ %). Nos résultats ont montré que la répétition des injections d'ISDN n'entraîne pas d'altération persistante des CIDN mais plutôt une diminution transitoire de leur efficacité.

Il est à noter que, dans les conditions du protocole CIDN, l'injection d'ISDN (5^{ème} jour) a entraîné une augmentation de la réponse C pour 6 cellules sur 8 dans le groupe ISDN-5, ce qui correspond à la proportion retrouvée dans les précédentes conditions expérimentales (hors CIDN). Cette sensibilisation devenait significative à partir de 75 minutes après ISDN (Figure 35 E). en revanche, dans le groupe des animaux ISDN-1, nous n'observons pas de sensibilisation des neurones WDR (Figure 35 E).

Enfin, nous avons testé si, dans le groupe ISDN 5, il y avait une corrélation entre l'efficacité des CIDN et l'augmentation de la réponse C. Les résultats ont montré une corrélation inverse entre ces 2 paramètres ($r=-0,66$, $p= 0,035^*$), suggérant que l'importance de la réponse C pourrait en partie dépendre d'une baisse d'efficacité des CIDN. Cependant la valeur du coefficient de corrélation demeure relativement faible et ne permet donc pas de conclure.

V. L'ISDN entraîne une vasodilatation méningée de courte durée

Lors des enregistrements électrophysiologiques, nous avons également réalisé un suivi de la perfusion sanguine des méninges à l'aide d'une caméra utilisant un Laser Speckle (cf matériel et méthode).

Les modifications de perfusion ont été enregistrées en continu avant, pendant, et jusqu'à 2 heures après l'injection de l'ISDN. Ces enregistrements ont été réalisés dans la condition chronique c'est-à-dire sur des rats ayant subi 4 injections i.p. d'ISDN (avant la 5^{ème} injection) chez 17 animaux. Après avoir enregistré la vascularisation pendant plusieurs minutes afin d'établir une valeur de référence (témoin), la dernière (5^{ème}) injection d'ISDN (10 mg/kg) était effectuée par voie intraveineuse à une vitesse constante d'environ 1ml/min avec un volume de 1 ml/100 g. Certains paramètres physiologiques étaient enregistrés en parallèle (pression artérielle et fréquence cardiaque, pCO₂) et vérifiés comme stables sachant qu'une variation de ces paramètres peut entraîner des variations dans la perfusion des méninges

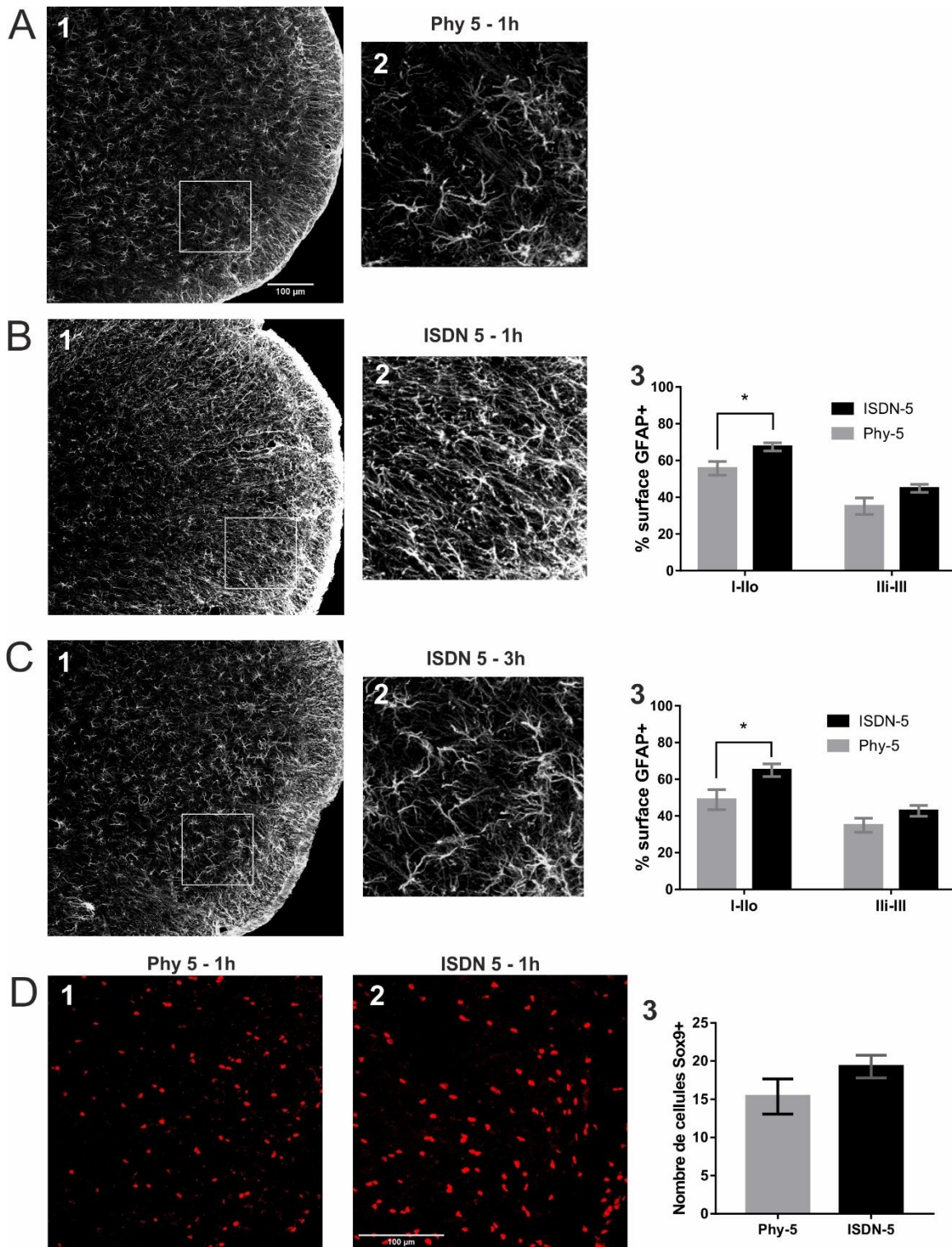


Figure 35: Immunomarkage de GFAP et Sox9 dans le Sp5C mesuré après injections répétées de sérum physiologique (Phy 5) ou d'ISDN (ISDN 5).

A1,2 ; B1,2, C1,2 : photographies montrant des exemples individuels de marquage de GFAP dans le Sp5C (1) avec focus sur la zone V1 (2). Après 5 injections d'ISDN, la surface occupée par le marquage GFAP est augmenté par rapport au groupe contrôle, 1h ($66,43 \pm 2,25 \%$ vs $55,75 \pm 3,68 \%$, $n=8$, $p^* = 0.0267$, t-test non apparié) (B3) et 3h ($64,94 \pm 3,45 \%$, $n=12$ vs $48,85 \pm 5,46 \%$, $n=10$, $p = 0.0166$, t-test non apparié) (C3) après la dernière injection d'ISDN. Cette augmentation est significative dans les couches superficielles du Sp5C (I-II). Par contre, le nombre d'astrocytes, dénombré grâce au marquage Sox9 (D1,2 et 3), n'est pas modifié par le traitement ISDN chronique ($19,3 \pm 1,49$, $n=5$ vs $15,38 \pm 2,30$, $n=4$, $p = 0,18$, t-test non apparié)

indépendamment de l'effet de l'ISDN sur la vascularisation. Cependant, comme cela a déjà été décrit dans la littérature, l'injection d'un donneur de NO à un effet hypotenseur immédiat, dû à son fort effet vasodilatateur. Cependant l'ISDN à un effet hypotenseur moindre par rapport à la nitroglycérine (Manabe et al., 2001).

La mesure de la perfusion a été déterminée en comparant les valeurs obtenues pendant les 50 secondes d'enregistrement avant l'injection et celles mesurées pendant les 50 secondes après le début de l'injection. Nos résultats ont montré que l'injection d'ISDN entraînait une variation de la perfusion de $407,10 \pm 14,26$ PU à $456,0 \pm 14,25$ PU pendant l'injection d'ISDN (Figure 36 (C)). Dans la même fenêtre de temps, la pression artérielle ($100,728 \pm 8,33$ mmHg vs $96,85 \pm 8,02$ mmHg) et la fréquence cardiaque ($412,89 \pm 8,55$ battements/minute vs $413,79 \pm 9,13$ battements/minute) n'ont pas été significativement modifiés. (t-test apparié, $n=17$, $p < 0,001$, $p=0,12$ et $p=0,76$ respectivement). L'effet immédiat de l'injection d'ISDN va durer environ 5 minutes. Durant le reste de l'enregistrement, aucune variation significative de la perfusion n'a été mesurée chez les 17 sujets enregistrés.

Ainsi, l'injection i.v. d'ISDN entraînait une augmentation de la perfusion (visible sur le graphique B et sur les exemples d'images de perfusion e A) alors que les valeurs de pression artérielle et de fréquence cardiaque ne variaient pas de façon significative. Cette fenêtre temporelle courte montrait que les variations de perfusions étaient d'une part très rapides et duraient peu de temps.

Les astrocytes et la sensibilisation trigéminal

I. Les astrocytes présentent un phénotype réactif en condition ISDN chronique

Les astrocytes activés présentent un phénotype particulier appelé « astrogliose » qui est caractérisée par une augmentation de l'expression de certains marqueurs tels que la protéine GFAP ou S100 β . Dans notre étude, le marqueur astrocytaire GFAP a été utilisé, et la réactivité astrocytaire a été évaluée en mesurant la surface occupée par le marquage immunohistochimique GFAP+ entre les différentes conditions, dans l'aire V1 du Sp5C, avec une fenêtre de quantification rectangulaire mesurant $200 \times 300 \mu\text{m}$ (voir Matériel et méthode). Cette mesure a été réalisée 1h (pic allodynie) et 3h après la 5^{ème} injection d'ISDN (Figure 37).

Une heure après injection i.p. d'ISDN, le marquage GFAP+ est plus important chez les animaux ayant reçu 5 injections d'ISDN par rapport au groupe contrôle. Cette augmentation est significative uniquement dans les couches superficielles ($66,43 \pm 2,255$ % GFAP + ISDN-5 vs $55,75 \pm 3,678$ % GFAP+ Phy-5, n=6 par groupe, p = 0,027). On pouvait noter une tendance à l'augmentation du marquage également dans le cas des couches profonde ($44,83 \pm 2,216$ % GFAP+ vs $35,11 \pm 4,507$ % GFAP+, n=6, p=0,0734). L'augmentation significative du marquage GFAP+ se retrouvait également 3 heures après injection d'ISDN (après le pic d'allodynie) au niveau des couches superficielles (I-IIo, $64,94 \pm 3,448$ % GFAP+ n=10, ISDN-5 vs $48,85 \pm 5,463$ % GFAP+, Phy-5, n=10 par groupe ; p= 0,0166) mais pas dans les couches profondes (IIi – III : $42,82 \pm 2,994$, n=10 vs $34,95 \pm 3,847$, p= 0,114).

Cette augmentation de la surface GFAP+ peut être due soit à une augmentation de l'expression de GFAP par les astrocytes, soit à la multiplication des astrocytes et donc une augmentation du nombre de cellules GFAP+, ou même aux 2 phénomènes. En effet, nous savons que les astrocytes activés peuvent modifier l'expression de certaines protéines dont GFAP et dans les cas d'une activation prolongée peuvent aussi se multiplier. Ainsi, de manière à quantifier le nombre d'astrocytes nous avons identifié un marqueur spécifique du noyau des astrocyte Sox9 et donc un anticorps spécifique (Sun et al., 2017b). L'analyse du marquage immunohistochimique des cellules exprimant Sox9 avec la même fenêtre de quantification que pour mesurer la surface GFAP positive, n'a pas permis de montrer une différence significative entre les animaux ayant reçu 5 injections d'ISDN et les animaux contrôles. ($19,3 \pm 1,488$, n=5 ; $15,38 \pm 2,304$, n=4).

Ainsi, l'étude de l'expression neurochimique du marqueur astrocytaire GFAP dans le Sp5C après 5 injections d'ISDN a révélé des signes de réactivité astrocytaire : une augmentation de la surface occupée par le marqueur GFAP au niveau des couches superficielles sans modification du nombre d'astrocyte (Sox9+). Ceci laisse suggérer un épaissement des prolongements astrocytaires mais pas de multiplications cellulaires.

Nous avons vu en introduction que les astrocytes, une fois activés, vont non seulement subir des modifications morphologiques mais également modifier leur activité, en augmentant la libération de gliotransmetteurs notamment. Nous avons donc testé si en ciblant les astrocytes la sensibilisation trigéminal était modifiée.

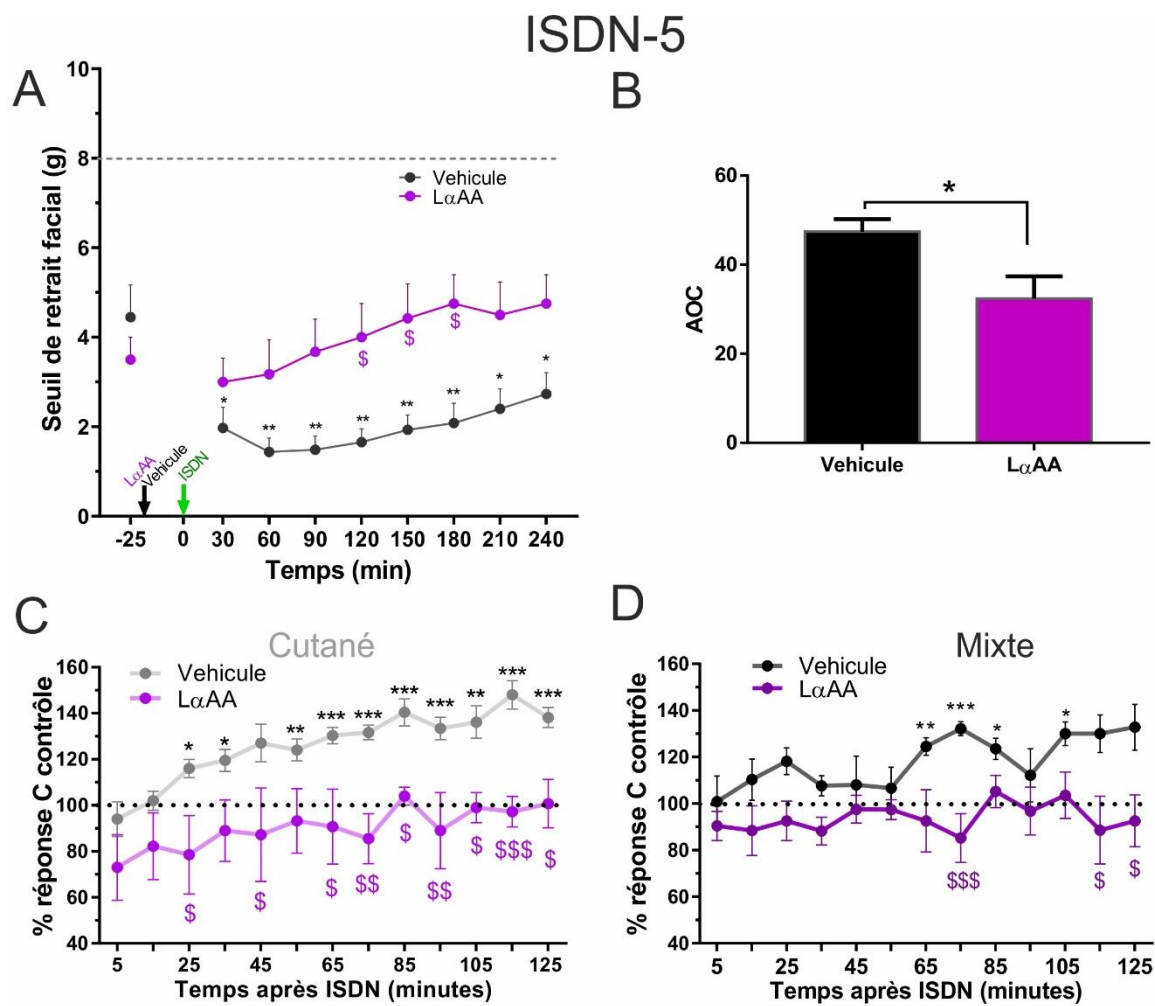


Figure 36 : Effets de la gliotoxine L α AA sur l'allodynie mécanique cutanée faciale et l'augmentation de la réponse C des neurones WDR du Sp5C induites par la 5^{ème} injection iv d'ISDN (ISDN 5).

A : Allodynie induite par la 5^{ème} injection d'ISDN mesurée après injection intracisternale préventive d'aCSF ou de L α AA. * différences par rapport à la valeur du seuil contrôle avant injections, \$ différences entre valeurs des seuils aCSF et L α AA aux temps correspondants. Noter que la valeur du seuil avant l'injection est d'environ 4g (allodynie persistante). B : réduction par le L α AA de la valeur de l'allodynie (calculée à partir de l'AOC). C et D valeurs des réponses C des neurones cutané (C) ou et mixtes (D) du Sp5C (exprimés en % du contrôle avant injections) après injections ict de aCSF (vehicule) ou de L α AA * différence par rapport à la valeur de la réponse C avant injections, \$ différences entre valeurs aCSF et L α AA aux temps correspondants.

II. Le blocage de l'activité des astrocytes prévient la sensibilisation trigéminal

Afin de tester l'hypothèse de l'implication des astrocytes dans la sensibilisation centrale trigéminal dans le modèle de migraine par donneur de NO, nous avons entrepris une étude pharmacologique appliquée aux approches comportementale et électrophysiologique. Ainsi, nous avons mesuré et analysé les effets d'un inhibiteur de l'activité astrocytaire, le L- α aminoacétique (L α AA).

A. Inhibition de l'allodynie cutanée chez le rat vigile.

Le L α AA (150 nmol/5 μ L, n=8) ou un volume équivalent de véhicule (n=12) était injecté localement sur le Sp5C par voie intracisternale, 20 minutes avant l'ISDN et le suivi de la sensibilité cutanée était évalué toutes les 30 minutes (Figure 38 (A)) sur une période de 4h chez le rat mâle.

Nos résultats montrent que le L α AA bloque les effets de la 5^{ème} injection d'ISDN sur la sensibilité mécanique céphalique. Nous avons observé une différence significative entre le groupe témoin et le groupe L α AA aux temps.120 ($1,66 \pm 0,30$ g, véhicule, n=12 vs $4,0 \pm 0,76$ g avec L α AA, n=8, p=0,046), 150 ($1,93 \pm 0,33$ g, véhicule vs $4,425 \pm 0,77$, L α AA, p=0,025) et 180 minutes ($1,65 \pm 0,30$ g vs $4,75 \pm 0,65$ g L α AA, p=0,0136) après ISDN. Cette différence est retrouvée en comparant l'AOC entre le groupe véhicule et le groupe L α AA ($47,45 \pm 2,78$ g n=12 vs $32,35 \pm 5,01$ g, n=8, p= 0,030).

Ainsi, le traitement préventif avec le L α AA réduisait l'aggravation de l'allodynie induite par la 5^{ème} injection d'ISDN sans bloquer l'allodynie persistante induite par l'injection répétée d'ISDN (4 injections). Ici nous montrons que le blocage de l'activité astrocytaire dans son ensemble, a donc un effet anti-allodynique. Cela suggère que les astrocytes, dans un contexte d'allodynie persistante induite par l'injection répétée d'un donneur de NO, participent à l'aggravation de cette allodynie lors d'une induction supplémentaire.

B. Inhibition de la sensibilisation des neurones WDR

Nous avons injecté la L α AA (même dose, même timing qu'en comportement) avant d'injecter l'ISDN, et nous avons suivis la réponse des neurones WDR.

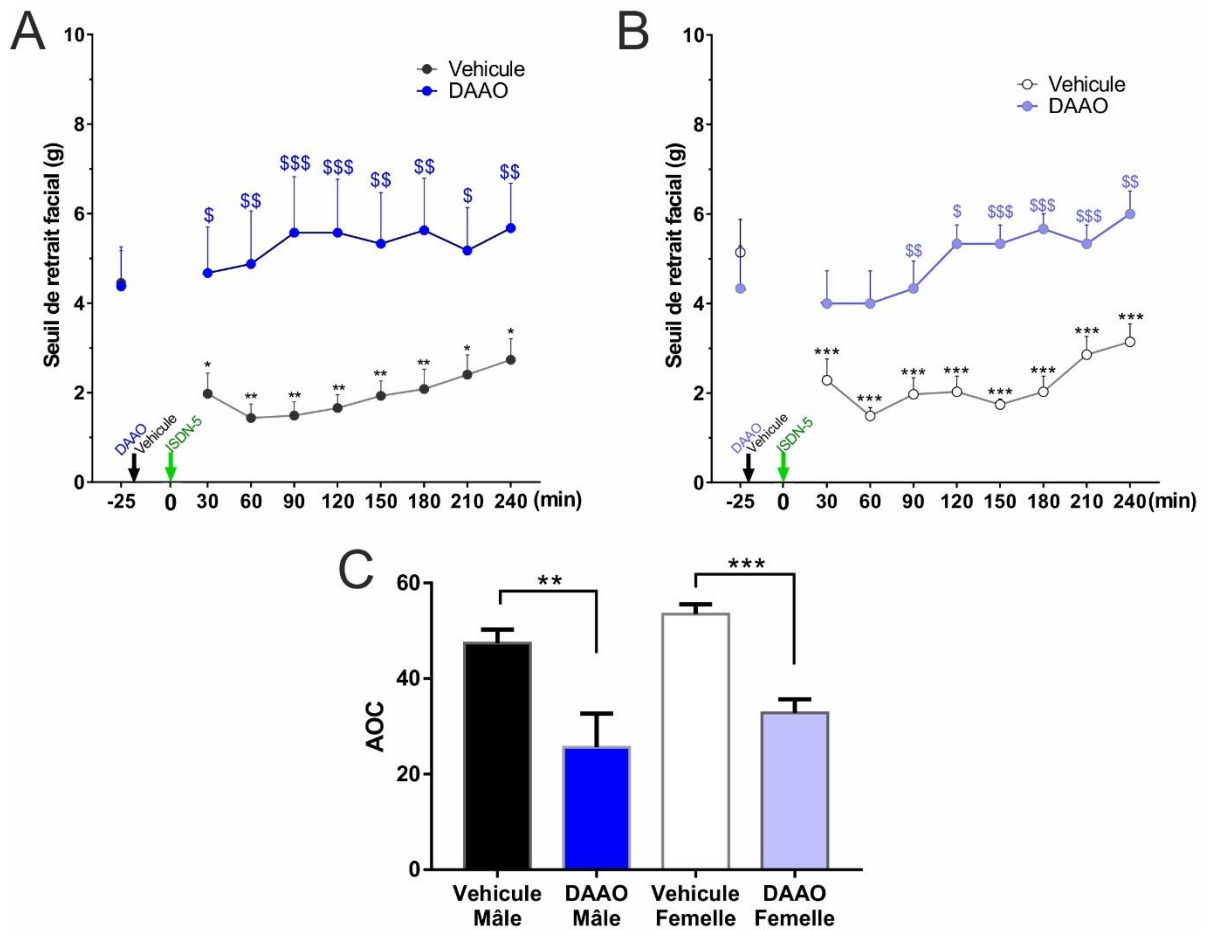


Figure 37 : Effets du blocage de la dégradation de la D-Sérine par la DAAO sur l'allodynie mécanique cutanée faciale induite par la répétition des injections d'ISDN

A, B : Allodynie induite par la 5eme injection d'ISDN mesurée chez le mâle (A) et la femelle (B) après injection intracisternale préventive d'aCSF ou de DAAO. * différences par rapport à la valeur du seuil contrôle avant injections, \$ différences entres valeurs des seuils aCSF et DAAO aux temps correspondants. Noter que la valeur du seuil avant l'injection est d'environ 4g (allodynie persistante). C : réduction par la DAAO de la valeur de l'allodynie (calculée à partir de l'AOC).

Avec le traitement préventif de L α AA, la réponse C des neurones n'est pas significativement modifiée après injection d'ISDN par rapport aux contrôles. Il y a une différence significative entre le groupe L α AA et Véhicule à partir de 25 minutes post ISDN pour les cellules Cutanées ($116,0 \pm 4,0\%$ des contrôles pour le groupe véhicule, $n=10$, $78,5 \pm 17,7\%$ contrôles avec L α AA, $n=4$, $p=0,025$) et à 75 minutes post ISDN pour les cellules Mixtes ($132,2 \pm 3,02\%$ des contrôles pour le groupe véhicule, $n=6$ vs $85,2 \pm 10,49\%$ des contrôles pour le groupe L α AA, $n=5$, $p=0,0031$). Le traitement préventif L α AA bloque les effets de la 5^{ème} injection sur la réponse C des neurones WDR, aussi bien pour les neurones cutanés (Figure 38, C) que les neurones mixtes (Figure 38, D).

III. La sensibilisation trigéminal est D-sérine dépendante

Un des vecteurs dans cet effet pourrait être la D-sérine, libérée par les astrocytes, et co-agoniste des récepteurs NMDA qui jouent un rôle majeur dans la plasticité et donc la sensibilisation neuronale. Nous avons donc testé l'effet de la DAAO (D-amino acid oxydase, 0,17 U, i.c.t., 20 minutes avant ISDN) qui est l'enzyme de dégradation de la D-sérine, chez le mâle et chez la femelle. Enfin, nous avons testé la D-sérine de façon à renverser les effets des inhibiteurs du L α AA montrés au paragraphe précédent.

A. L'allodynie mécanique dépend de la D-sérine

Nos résultats ont montré que la DAAO provoquait un effet inhibiteur sur l'allodynie et ce plus rapidement et plus fortement que le L α AA chez le mâle (Figure 39 (A)). En effet l'hypersensibilité céphalique des animaux ayant reçu de la DAAO est significativement moins importante dès 30 minutes ($1,97 \pm 0,46$ g, groupe véhicule, $n=12$ vs $4,67 \pm 1,02$ g, groupe DAAO, $n=8$, $p=0,0196$) et jusqu'à la fin du suivi à 240 minutes ($2,73 \pm 0,47$ g vs $5,67 \pm 1,0$ g, Figure 39 (A)). L'étude de l'AOC montre une différence significative entre le groupe Véhicule et DAAO ($47,45 \pm 2,78$ $n=12$ vs $25,65 \pm 7,00$ $n=8$, $p=0,0028$) (Figure 39 (C)).

L'effet anti-allodynique préventif de la DAAO a été montré de la même manière chez le rat femelle à savoir une diminution de l'allodynie induite par la 5^{ème} injection d'ISDN Figure 39 (F). Cet effet est significatif à partir de 60 minutes post-ISDN ($2,29 \pm 0,47$ g, groupe véhicule, vs $4 \pm 0,73$ g, groupe DAAO, $n=6$, $p=0,056$) et jusqu'à la fin du suivi à 240 minutes ($3,143 \pm 0,40$ g vs $6,0 \pm 0,516$, $p=0,001$ Figure 39 (B)).

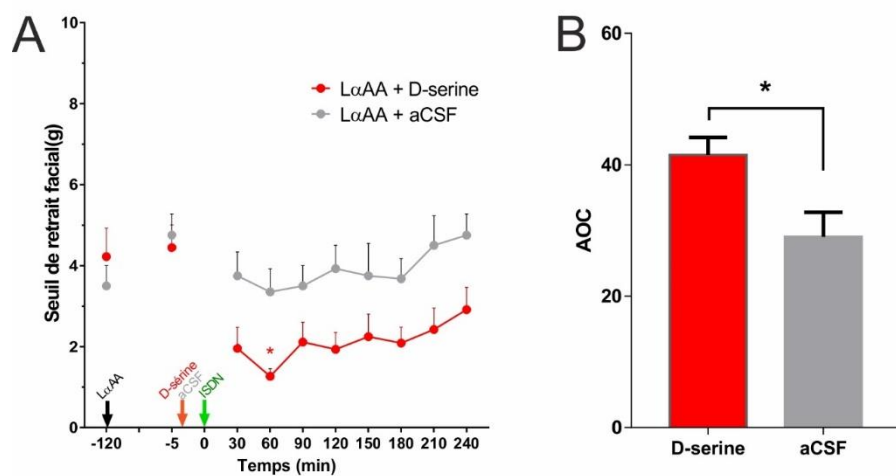


Figure 38 : Rétablissement de l'allodynie par injection ict de D-Sérine. A : Le L α AA (150nmol) est injecté 120 min avant la 5^{ème} injection d'ISDN. L'injection de D-Sérine (100 μ g, ict) renverse l'effet du L α AA en rétablissant une baisse du seuil de retrait facial. B : Comparaison de la valeur de l'allodynie (calculée à partir de l'AOC) entre le groupe L α AA + Acsf + ISDN (aCSF) et le groupe L α AA + D-Sérine + ISDN (D-Sérine).

L'AOC montrait aussi une différence entre le groupe témoin aCSF et DAAO chez la femelle (AOC : $53,46 \pm 2,077$, $n=7$ pour le groupe aCSF vs $32,83 \pm 2,822$, $n=6$, $p < 0,001$)

Afin de confirmer que cet effet est bien spécifique de la D-sérine, nous avons injecté le L α AA 2h avant l'injection d'ISDN (nous avons montré une différence significative chez les animaux L α AA à partir de 2h après injection d'ISDN), puis juste avant l'injection d'ISDN nous avons réalisé une injection de D-sérine (100 μ g, $n=9$) ou d'aCSF ($n=8$). Chez les animaux ayant reçu une injection de L α AA sans D-sérine l'injection d'ISDN n'a pas entraîné d'aggravation d'allodynie (Figure 40 (A)), comme c'était le cas dans le protocole précédent Figure 38 (A). En revanche, pour les animaux ayant reçu une injection de D-sérine juste avant l'ISDN, nous avons retrouvé une aggravation de l'allodynie céphalique comme chez les animaux contrôles (Figure 40 en (A) et (B)). L'étude de l'AOC montre également une différence significative entre les 2 groupes d'animaux ($29,05 \pm 3,721$, $n=8$ avec aCSF vs $41,5 \pm 2,676$, $n=9$ avec D-sérine, $p=0,0145$). Ce résultat permet de renforcer le résultat précédent à savoir que la D-sérine libérée par les astrocytes est impliquée dans la sensibilité céphalique dans le modèle de migraine chronique.

B. La DAAO prévient la sensibilisation des neurones WDR

Nous avons appliqué de la DAAO en intracisternale (0,17U) en préventif, 20 minutes avant d'injecter l'ISDN, et nous avons suivi la réponse des neurones WDR.

Tout comme le traitement avec la gliotoxine L α AA, nous montrons que la DAAO prévient l'augmentation de la réponse C induite par la 5^{ème} injection d'ISDN, aussi bien pour les neurones cutanés (Figure 40, A, $n=10$ pour le groupe véhicule et $n=7$ pour la DAAO) que les neurones mixtes (Figure 40, B, $n=6$ pour le groupe véhicule, et $n=8$ pour la DAAO). Nous avons montré que la sensibilisation des neurones du Sp5C passait par une augmentation à la fois de l'input C et du wind-up. Comme la D-sérine est un co-agoniste du récepteur NMDA (impliqué dans la génération du wind-up), nous avons analysé l'effet de la DAAO sur ces paramètres.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 40 (C) et (D), en présence de DAAO, la dynamique de la réponse au cours des 30 stimulations électrique n'est pas modifiée. Notamment, sur la phase d'amplification (15 premières stimulations), nous n'observons pas d'augmentation de cette phase après injection d'ISDN contrairement à ce qui était présenté

ISDN-5

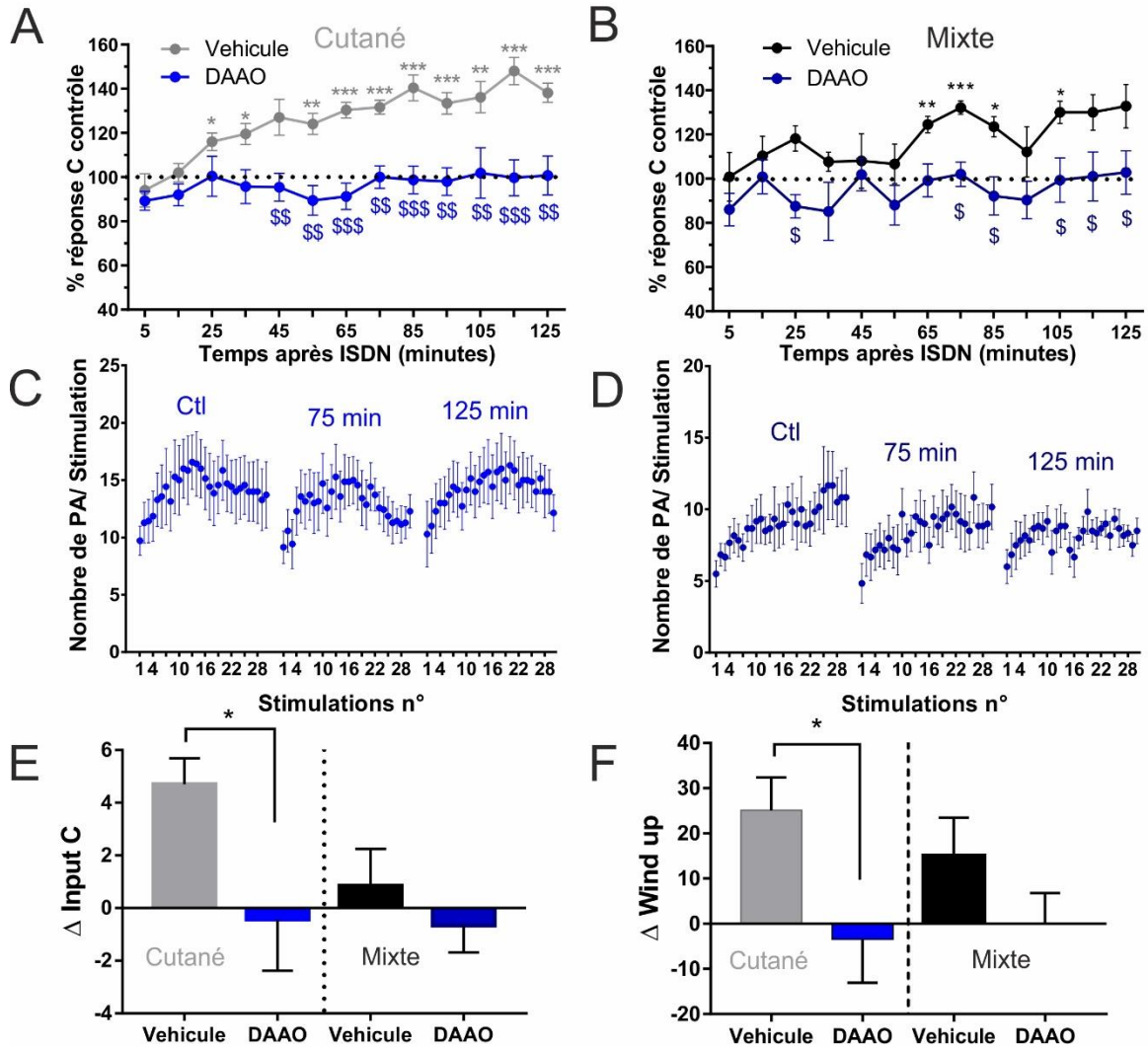


Figure 39 : Effets de l'injection ict préventive de DAAO sur l'augmentation de la réponse C induite par ISDN-5 en fonction du type de champ récepteur.

A et B : Réponse C moyenne (\pm SEM) exprimé en % des contrôles.* différences par rapport à la valeur contrôle avant injection, \$ différences entre les valeurs en condition véhicule et DAAO aux temps correspondants n= 7 pour les cutané et n=8 pour les mixtes. C et D: Amplification (wind-up) de la réponse C au fur et à mesure des 30 stimulations (0.66 Hz) mesurée avant (ctl), 75 min et 125 min après injection d'ISDN précédée d'une injection ict de DAAO, au niveau des neurones à champ cutané (C) et mixte (D). E : Comparaison de la variation de l'input C (entre input C contrôle et input C 125 min après ISDN) induite par l'ISDN entre les groupes véhicule et DAAO préventive. F Comparaison de la variation du wind-up après ISDN (entre wind up contrôle et wind up 125 min après ISDN) entre les groupes véhicule et DAAO préventive. NB : l'augmentation de l'input C et du wind-up (induite par l'ISDN) est bloquée par la DAAO pour les neurones à champ cutané.

Figure 34 (C.). Pour quantifier cet effet, nous avons calculé le wind-up et l'input C en présence de DAAO pour les cellules cutanées et mixtes avec la méthode décrite précédemment. Nous avons ensuite calculé la différence entre la valeur du wind-up et de l'input C entre les contrôles et la valeur 125 minutes après ISDN pour les cellules cutanées.

La variation de l'input C était de $+4,7 \pm 0,989$ PA, $n=10$ pour le groupe contrôle, contre $-0,67 \pm 1,02$ PA, $n=7$ pour le groupe ISDN. La DAAO bloque donc l'augmentation de l'Input C de manière significative. ($p=0,0277$). Pour le wind-up, sa valeur a augmenté de $+25,15 \pm 7,23$ pour le groupe contrôle, avec le traitement DAAO $+3,5 \pm 9,55$, $n=7$. La DAAO est aussi efficace sur l'augmentation du wind-up pour les cellules mixtes ($p= 0,028$). L'effet mesuré sur la réponse C globale résultant donc d'un effet sur les 2 paramètres.

Nous avons également calculé la variation de ses paramètres pour les cellules mixtes. Cependant nous avons vu précédemment que la 5^{ème} injection d'ISDN a un effet limité sur ces paramètres. Pour les cellules mixtes, nous avons comparé la valeur contrôle et la valeur à 75 minutes post-ISDN qui correspond au maximum de l'effet de l'ISDN sur la réponse C. Le traitement préventif avec la DAAO ne modifie pas significativement ni le wind-up ni l'input C.

Chapitre 4 : Discussion et perspectives

Discussion

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre le rôle des astrocytes dans les mécanismes physiopathologiques de la migraine, et plus particulièrement, de la progression vers le stade chronique de la maladie. Notre étude a été réalisée en utilisant un modèle de migraine par donneur de NO comme l'IsoSorbide diNitrate (ISDN, Flores Ramos et al. 2017 ; Dallel et al., 2017). Les modèles par donneur de NO chez le rongeur, comme ceux utilisant la Nitroglycerine, ont l'avantage d'être applicables chez l'homme et donc permettre une recherche translationnelle entre fondamental et clinique (Ackermann et al., 2019).

Nous avons confirmé les résultats des études précédentes réalisées dans le laboratoire, à savoir que la répétition des injections d'ISDN (5 injections/ 5 jours) provoque chez le rat mâle une allodynie mécanique céphalique qui devient persistante avec la succession des injections. Pour la première fois, nous avons montré que l'allodynie se manifeste de la même manière chez la femelle.

De plus, chez le mâle, la répétition produit une sur-expression de p-ERK conditionnée par la stimulation mécanique, au niveau du ganglion trigéminal et du Sp5C. Dans les mêmes conditions chroniques, nous avons montré une sensibilisation centrale des neurones WDR du Sp5C. Nos résultats montrent que l'augmentation des réponses nociceptives de type C des neurones WDR était associé à la fois à une augmentation de l'input C et du wind-up. Cependant cette sensibilisation affecte de façon différente les neurones en fonction des afférences qu'ils reçoivent : ceux cutanés exclusif sont sensibilisés de manière importante tandis que ceux à convergence méningée et cutanée présentent une sensibilisation modérée.

Pour la première fois, nos résultats rapportent que l'allodynie mécanique provoquée par les injections d'ISDN et la sensibilisation centrale qui y est associée sont dépendants de l'activité astrocytaire. La répétition de l'administration d'ISDN provoque une surexpression de la GFAP au niveau du Sp5C, traduisant ainsi une activation des astrocytes. Par ailleurs, la gliotoxine L α AA prévient, à la fois, l'apparition de l'allodynie mécanique faciale et la sensibilisation des neurones WDR du Sp5C.

Etant donné que, les astrocytes semblent être un élément important dans la mise en place de la sensibilisation centrale dans le modèle ISDN, nous avons recherché comment les astrocytes intervenaient dans ce mécanisme. Sachant que la sensibilisation centrale est liée à

l'activation du récepteur NMDA, qui est d'ailleurs nécessaire pour engendrer le wind-up des réponses C, nous avons porté notre attention sur le co-agoniste du récepteur NMDA : la D-sérine qui est un gliotransmetteur libéré par les astrocytes. Ainsi, nos résultats ont montré que la dégradation de la D-sérine par son enzyme la DAAO prévient l'hypersensibilité céphalique chez le mâle et la femelle ainsi que la sensibilisation des neurones WDR induites par l'ISDN. Enfin, nous avons confirmé le rôle de la D-sérine dans l'allodynie en montrant qu'elle abolissait l'effet protecteur de la gliotoxine L α AA sur l'hypersensibilité céphalique.

I. Une sensibilisation centrale dès le stade aigu.

L'allodynie céphalique est un symptôme reflétant une sensibilisation centrale et l'apparition de ce symptôme est un facteur de progression de la migraine (Bigal et al., 2008; Louter et al., 2013).

En condition aiguë, c'est-à-dire après une seule injection de donneur de NO, nos résultats montrent une allodynie transitoire avec un pic 1 heure après l'injection, puis un retour aux valeurs contrôles à 180 min. Dans les mêmes conditions, nous observons une sensibilisation centrale au niveau du Sp5C, comme le montre l'augmentation de la réponse C des neurones WDR qui est aussi transitoire puisqu'elle débute tardivement (+ 85 min) et ne perdure pas au-delà de 115min post ISDN. Ces résultats confirment la présence d'une sensibilisation centrale chez le rat comme montré par une étude précédente avec la même substance (Flores Ramos et al., 2017). En effet, l'ISDN augmente l'expression de pERK évoquée par la formaline dans le Sp5C ainsi que la réponse C des neurones WDR. La sensibilisation du Sp5C a été aussi rapportée dans des études utilisant des donneurs différents comme la nitroglycérine ou le nitroprusside de sodium (Reuter et al., 2002; Tassorelli and Joseph, 1995; Tassorelli et al., 2005). Cette sensibilisation centrale dès le stade aigu est également observable, *via* l'expression de la protéine Fos ou les enregistrements de l'activité nociceptive des neurones du Sp5C dans d'autres modèles de migraine comme celui de la soupe inflammatoire appliquée au niveau méningé (Burstein et al. 1998, Boyer et al., 2014)

II. Une sensibilisation centrale qui s'amplifie avec le stade chronique.

Dans notre étude, la répétition des « crises » allodyniques via l'ISDN provoque une aggravation de l'intensité de l'allodynie avec des seuils de retrait facial encore plus bas que

lors de la première injection. De plus, le seuil très bas constaté avant la 5^{ème} injection est le témoin d'une persistance de l'hypersensibilité cutanée. Ces résultats sont conformes avec ceux obtenus précédemment avec le même modèle (ISDN : Dallel et al., 2017) et ceux obtenus par d'autres équipes (Ben Aissa et al., 2018; Greco et al., 2018; Mohammadi Vosough et al., 2019; Moye et al., 2019; Pradhan et al., 2014a).

Si nous comparons l'augmentation de la réponse C des neurones WDR du Sp5C après 1 et 5 injections, nous constatons que la sensibilisation centrale après 5 injections apparaît de façon plus précoce (+25 min) et qu'elle perdure au-delà des limites de nos enregistrements (>125 min). De plus, les réponses mécaniques au vF 4g et 8g sont augmentées uniquement après ISDN-5.

Nous montrons également que les stimulations mécaniques, après 5 injections, induisent une augmentation de l'expression de p-ERK au niveau du Sp5C ce qui traduit une sensibilisation centrale. Nous ne disposons pas de données du marquage suite à une injection seule d'ISDN et donc nous ne pouvons pas établir de comparaison permettant de montrer une éventuelle augmentation de l'expression dans le cas chronique. Cette amplification de la sensibilisation centrale est rapportée par l'étude de Boyer et al., en 2014. En effet avec le modèle soupe inflammatoire répétée les auteurs montrent une expression de la protéine Fos (induit par stimulation mécanique cutanée) qui s'accroît avec la répétition. Comme dans notre étude, les neurones p-ERK positifs sont observables presque exclusivement dans les couches superficielles du Sp5C, site majeur d'intégration et de modulation des messages nociceptifs trigéminaux.

Comme la migraine est une pathologie à forte prévalence féminine, notre approche comportementale a été réalisée chez les deux sexes et rapportent certaines différences qui peuvent faire écho aux données cliniques.

III. Différences mâle et femelle dans le modèle ISDN

De façon paradoxale, la plupart des études ont été menées chez le mâle et ce n'est que récemment que des travaux ont été réalisés chez la femelle. Ces études, *via* l'analyse comportementale des effets de l'injection de donneur de NO, rapportent qu'il n'y pas de différences entre les 2 sexes à la fois chez le rat (Mohammadi Vosough et al., 2019) et chez la souris (Moye et al., 2019; Pradhan et al., 2014a, 2014b). Cependant, la différence mâle vs

femelle n'étant le sujet de l'étude, cela n'a pas été discuté dans ces travaux, malgré la prévalence féminine de la migraine.

Cela peut tenir au modèle lui-même. En effet, les études cliniques rapportent que l'homme et la femme sont répondeurs de la même manière à la crise de migraine déclenchée par l'injection d'un donneur de NO (Afridi et al., 2004).

Cependant, des données obtenues par des approches différentes (immunohistochimie, q-PCR, Western-blot) ont mis en évidence des différences entre les mâles et les femelles. Une étude réalisée chez le rat (Greco et al., 2013) a montré qu'après une injection de NTG, l'expression de la protéine Fos au niveau du Sp5C, était plus importante chez les femelles que chez les mâles. Mais cette différence de l'activation neuronale ne semble pas être suffisante pour provoquer un phénotype male/femelle différent.

Par ailleurs, d'autres études se sont intéressées aux différences mâle/femelle dans l'expression du CGRP au niveau du système trigéminal, sachant qu'il est un des acteurs clé dans la physiopathologie de la migraine. L'application de CGRP sur les méninges entraîne une allodynie faciale chez la femelle et non chez le mâle (Avona et al., 2019; Levy et al., 2005). Ceci pourrait être expliqué par la sur-expression dans le Sp5C, chez les femelles par rapport au mâle, d'un récepteur du CGRP (RCP receptor component protein) jouant un rôle majeur dans la sensibilisation centrale induite par le CGRP (Ji et al., 2019b).

Nos résultats, en condition basale, montrent une différence significative au niveau des seuils mécaniques céphalique entre mâle et femelle. Ainsi, l'allodynie ISDN induite entre mâle et femelle est comparable en termes de maximum d'effet et de durée. Cependant, les femelles présentent un seuil de retrait facial de base plus élevé que les mâles, ce qui signifie que l'amplitude de l'allodynie est supérieure pour les femelles. Ce résultat suggère que l'hypersensibilité pourrait être supérieure chez la femelle dans le modèle ISDN, comme l'a démontré la mesure de l'AOC.

De façon intéressante, nous ne retrouvons pas, dans le cas des injections répétées, de différence significative pour l'allodynie entre les mâles et les femelles. En effet, à ce stade existe une allodynie persistante avec un seuil de retrait facial équivalent pour les deux sexes. Ceci suggère que la sensibilisation persistante serait due à un mécanisme sexe-indépendant. En accord avec cela, les données cliniques montrent que la proportion homme/femme reste

la même pour les stades épisodiques et chroniques (Schramm et al., 2013). Dans l'étude de (Buse et al., 2012), la migraine chronique est représentée chez 7,45% des femmes migraineuses et chez 8,47% des hommes migraineux, ce qui suggère que les mécanismes de chronicisation de la migraine ne sont pas sexe-dépendant.

IV. La sensibilisation des neurones WDR du Sp5C par la répétition des injections d'ISDN

Notre étude est la première montrant une sensibilisation centrale des neurones WDR trigéminaux à la suite de l'administration répétée d'ISDN chez le rat. Elle complète celle de Flores Ramos qui montrait une augmentation de la réponse C de ces mêmes neurones lors d'une injection unique sur des animaux Naïfs.

A. Les injections répétées ne modifient pas les caractéristiques basales des neurones WDR

La comparaison des caractéristiques des neurones WDR, à savoir le seuil de déclenchement des réponses dues à la mise en jeu des fibres A δ et C, leur activité spontanée, et leur réponse aux stimulations mécaniques, n'a pas montré de différence significative entre les animaux Naïfs et les animaux ayant reçu 4 injections d'ISDN. Ces résultats ne sont pas concordants avec le fait que les animaux ISDN à ce stade présentent une allodynie céphalique persistante qui a été testée avant de procéder à l'enregistrement des neurones. Nous n'avons pas à ce stade, d'explication claire de cette contradiction dans les résultats comportementaux et électrophysiologiques, d'autant qu'avec le modèle par injection répétée de soupe inflammatoire sur les méninges, Boyer et al., 2014, montrent une augmentation de l'activité spontanée, de la réponse mécanique et un agrandissement des champs récepteurs cutanés des neurones WDR du Sp5C après 3 injections répétées de soupe inflammatoire. Bien que nous n'ayons pas effectué une analyse quantitative de l'évolution des aires des champs récepteurs de neurones avant et après traitement ISDN, nous avons remarqué cependant que les champs récepteurs des neurones d'animaux soumis à la répétition de l'ISDN étaient plus étendus par rapport aux animaux Naïfs.

Concernant l'activité spontanée, certains travaux sont en accord avec nos résultats (Flores Ramos et al., 2017; Jones et al., 2001; Melo-Carrillo et al., 2017) tandis que d'autres montrent une augmentation 1 heure après injection de NTG (Akerman et al., 2019; Koulchitsky et al., 2004). Une étude effectuée dans des conditions expérimentales similaires aux nôtres a montré que l'activité spontanée des neurones WDR méningés du Sp5C enregistrés *in vivo* était due à l'activité des neurones périphériques, l'injection lidocaïne dans le ganglion trigéminal entraînait un arrêt complet de l'activité spontanée des neurones centraux (Roch et al., 2007). Les auteurs font l'hypothèse que l'activité spontanée basale était due à une sensibilisation des méninges à la suite de la chirurgie permettant d'exposer ce territoire.

B. Différences entre neurones à champ cutané et neurones à champ mixte

Nous avons enregistré l'activité de neurones à champ cutanés exclusifs et de neurones dits mixtes possédant des champs récepteurs à la fois méningés et cutanés. Ainsi nous avons pu distinguer dans notre analyse les effets des traitements sur des cellules recevant directement des informations méningées ou non.

Nous avons ainsi montré que l'injection d'ISDN en aigu entraîne une augmentation de la réponse C dans 83% des cellules mixtes. Cependant les cellules ne sont pas toutes sensibilisées en même temps. En effet, la moitié d'entre elles le sont au cours de la première heure post-ISDN, tandis que l'autre moitié l'est plus tardivement à partir de 80 min. Cette variabilité temporelle de la réponse explique pourquoi l'effet moyen de l'ISDN n'est pas significatif au cours du temps. Il serait nécessaire d'enregistrer un nombre plus important des différentes catégories de cellules pour confirmer ce résultat. Pour les cellules cutanées, seules 50% des cellules testées ont été sensibilisées, à partir de 85 minutes après l'injection unique d'ISDN, résultat qui correspond à celui obtenu dans l'étude réalisée en 2017 par Flores Ramos et collaborateurs (Flores Ramos et al., 2017).

Ces résultats concernant les cellules cutanées et mixtes suggèrent qu'après une injection, la sensibilisation trigéminal est limitée. Elle ne touche qu'une partie des neurones WDR, en majorité ceux recevant des afférences méningées. La réponse comportementale mesurée après une injection d'ISDN, à savoir une allodynie céphalique transitoire, pourrait être liée à la sensibilisation de ces 2 types de cellules, mais plus particulièrement aux cellules mixtes.

En condition chronique (5 injections), le nombre de cellule mixtes sensibilisées reste stable (67% des cellules, 6 sur 9), mais là encore le nombre de cellules enregistrées doit être augmenté pour confirmer cette proportion. En revanche, 10 neurones WDR « cutanés » sur les 12 testés, soit une proportion de 83%, sont sensibilisés. Par ailleurs, cette sensibilisation est plus précoce, à partir de 25 minutes post-ISDN contre 85 min suite à une injection unique d'ISDN.

Ces résultats remettent en question la notion selon laquelle la sensibilisation centrale trigéminal est dépendante des afférences méningées dans le modèle ISDN. Elle relèverait plutôt d'un mécanisme essentiellement central. Une étude de 2004 (Koulchitsky et al., 2004) a montré que l'injection de nitroprusside de sodium, qui est également un autre donneur de NO, avait les mêmes effets sur les neurones du Sp5C, que cette injection soit intracisternale ou systémique, suggérant ainsi que l'effet du donneur de NO passe avant tout par un effet central.

D'un point de vue plus général, les cellules cutanées et mixtes semblent présenter des différences dans leurs caractéristiques électro physiologiques, notamment dans le wind up. Nous avons observé que les cellules Mixte présentent un wind-up limité, malgré les conditions de stimulation permettant de générer un wind-up pour les cellules Cutanées. Nous sommes, à notre connaissance, les premiers à montrer une telle différence. Les cellules recevant des afférences méningées ont-elles une connectivité différente au sein de la corne dorsale du Sp5C à l'origine de cette différence ? Cette question pourra être intéressante à répondre dans un contexte de migraine, via l'utilisation de marqueur antérograde à partir des méninges par exemple.

C. Sensibilisation des neurones WDR aux stimulations mécaniques

La 5ème injection d'ISDN augmente la réponse à la stimulation mécanique statique (application des filaments vF 4g et 8G), mais est sans effet sur la réponse dynamique (brossage). L'absence d'effet sur les réponses à la stimulation dynamique n'est pas conforme aux résultats obtenus dans la littérature avec le modèle nitroglycérine aigu (Akerman et al., 2019) et le modèle d'injection répétée de soupe inflammatoire (Boyer et al., 2014). Ainsi, cette différence ne peut s'expliquer par une différence liée au type de modèle (donneur de NO) ou

au caractère chronique de la situation expérimentale (injection répétée). Nous pouvons cependant observer dans nos résultats une tendance à l'augmentation qui n'apparaît pas significative du fait de la variabilité de la réponse des neurones WDR au brossage.

D. Composante périphérique de la sensibilisation trigéminal

Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de p-ERK au niveau du ganglion trigéminal ainsi qu'une augmentation de l'input C, reflet de l'activation des fibres afférentes primaires, après injection d'ISDN. Ces 2 résultats suggèrent donc une activation des neurones périphériques. D'autre part, nous avons montré que l'ISDN entraînait immédiatement une dilatation transitoire d'environ 5 minutes des vaisseaux méningés. Dans notre étude nous observons donc un décalage de plusieurs dizaines de minutes entre l'effet purement vasculaire du NO et l'effet sur les neurones du ganglion trigéminal. Cependant, dans notre étude, nous ne pouvons pas affirmer que l'expression de p-ERK n'est pas modifiée avant ce délai de 1H post-ISDN. Ces résultats sont en accord avec des études chez le rat (Gozalov et al., 2007) et chez l'homme (Schoonman et al., 2008) qui montrent un effet vasculaire à court terme de l'injection du donneur de NO, de l'ordre de quelques minutes, alors que la céphalée migraineuse apparaît longtemps après la fin des effets vasculaire (Schoonman et al., 2008). Plus récemment Zhang et collaborateurs en 2013 ont montré que la nitroglycérine n'altérait pas l'activité spontanée des neurones du ganglion trigéminal, mais entraînait une hypersensibilité mécanique intracrânienne après un délai d'environ 180 minutes (Zhang et al., 2013).

V. Sensibilisation centrale trigéminal et altération des contrôles descendants inhibiteurs

L'activité nociceptive des neurones WDR ne dépend pas uniquement des informations provenant de la périphérie. En effet, elle doit être considérée aussi comme le résultat d'une modulation effectuée par les voies descendantes inhibitrices et facilitatrices de la nociception.

A ce titre, mesurer l'efficacité des contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive (CIDN) permet d'évaluer l'état des contrôles descendants inhibiteurs. Nos résultats n'ont pas montré d'altération persistante des CIDN, entre les animaux Naïfs et les animaux ISDN chroniques. Ce résultat est contradictoire par rapport à celui rapporté chez le rat avec le modèle de migraine par injection répétée de soupe inflammatoire au niveau

méningé (Boyer et al., 2014) où on observe une diminution de l'effet des CIDN sur la réponse C des neurones WDR du Sp5C. De même des CIDN dysfonctionnels sont retrouvés en clinique chez les patients migraineux (Sandrini et al., 2006).

La différence entre nos résultats et ceux de l'étude de Boyer et collaborateurs peut être due à plusieurs phénomènes. Premièrement, bien qu'une allodynie céphalique transitoire après une injection qui devient persistante avec la répétition des injections soit observée dans les deux modèles, les mécanismes à l'origine de l'allodynie pourraient être différents. En effet, dans le modèle donneur de NO systémique, l'ISDN peut agir aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau central, tandis que dans le modèle inflammatoire, les molécules inflammatoires agissent préférentiellement au niveau des méninges, c'est-à-dire au niveau périphérique. Deuxièmement, les conditions expérimentales dans les 2 études différaient par le gaz anesthésique utilisé. Dans l'étude de Boyer et collaborateurs, l'anesthésie était réalisée avec de l'halothane (0.6%-0.7), alors que dans notre étude, il s'agit d'isoflurane (0.75). Des gaz anesthésiques différents peuvent influencer de façon différente les structures supraspinales dont dépendent les CIDNs. Nous pouvons constater en particulier que l'inhibition de la réponse C par les CIDN est d'environ 60% pour notre étude avec l'isoflurane et une stimulation thermique à 49°C, tandis qu'elle est de 85 % avec l'halothane et une stimulation à 50°C dans l'étude de Boyer (Boyer et al, 2014) et de 88 % avec l'halothane et une stimulation à 48°C pour celle de Lapirot et collaborateurs en 2011. En conséquence, cette différence dans le gaz anesthésiant montrant un CIDN moins efficace dans notre étude pourrait constituer une autre explication de l'absence d'effet de la répétition des 4 injections d'ISDN sur ce paramètre.

En revanche, une 5^{ème} injection d'ISDN, entraîne une baisse de l'efficacité des CIDN significative à partir 75 minutes, jusqu'à la fin de l'enregistrement (125 minutes). Ainsi, nos résultats ont montré que la répétition des injections d'ISDN n'entraîne pas d'altération persistante des CIDN (qui serait visible avant la 5^{ème} injection) mais plutôt une diminution transitoire de leur efficacité. Nous pouvons aussi supposer qu'après une 6^{ème} voire une 7^{ème} injection d'ISDN, l'altération des CIDN devienne persistante. Enfin, il est à noter que l'altération des CIDN (après la 5^{ème} injection d'ISDN) est corrélée à l'augmentation de la réponse C.

De plus, chez les animaux naïfs, les CIDN ne sont pas altérés et seul un faible nombre de cellules ont été sensibilisées. Ces résultats suggèrent que la sensibilisation des neurones WDR en condition chronique pourrait résulter aussi de l'affaiblissement des CIDNs.

VI. Les astrocytes du Sp5C participent à la sensibilisation trigéminal

Au niveau du Sp5C, une augmentation du marquage GFAP, a été observée après la 5^{ème} injection d'ISDN au niveau du Sp5C. Cette activation est visible 60 et 180 minutes après injection d'ISDN. En revanche, il n'y a pas d'augmentation du nombre d'astrocytes (cellules Sox9 positives). Une augmentation de la surface occupée par l'immunomarquage GFAP sans modification du nombre d'astrocytes est interprétée comme un signe de réactivité astrocytaire puisqu'elle signe l'hypertrophie astrocytaire (Sofroniew et Vinters, 2010). Ces résultats suggèrent une astrogliose « modérée » puisque les astrocytes ne se divisent qu'en condition d'astrogliose sévère (Sofroniew, 2009). L'augmentation de l'expression de GFAP est retrouvée dans toutes les couches du Sp5C, mais de manière significative uniquement dans les couches superficielles (I-IIo). Ce résultat est à mettre en relation avec celui montrant une augmentation de l'expression de p-ERK (neuronal) dans les mêmes couches suite à l'injection d'ISDN. De plus, il y a une certaine correspondance entre le temps auquel apparaissent les surexpressions de GFAP et celui du pic d'allodynie (environ 1 heure). Même si nous ne savons pas si une variation de GFAP est effective avant 1h, ces résultats sont des éléments permettant de faire un premier lien entre activité des astrocytes et sensibilisation centrale des neurones du Sp5C.

L'approche pharmacologique a permis de montrer que le blocage de l'activité métabolique des astrocytes prévenait la sensibilisation centrale trigéminal, à savoir l'augmentation de la réponse C des neurones WDR et le blocage de l'aggravation de l'allodynie mécanique lors de la 5^{ème} injection d'ISDN. On retrouve des résultats similaires dans les modèles de douleur neuropathique, où une baisse de l'allodynie mécanique a été observée après administration de L α AA (Gao et al., 2010; Li et al., 2015; Zhang et al., 2011a). Ces résultats suggèrent donc que l'activité astrocytaire a une action pro-nociceptive en condition d'ISDN chronique.

Il est à noter cependant que le L α AA a empêché l'aggravation de l'allodynie induite par la 5^{ème} injection d'ISDN, mais n'a pas pour autant permis un retour du seuil de retrait facial aux valeurs contrôles (i.e 8g chez le rat male). L'injection de L α AA seule, avant l'injection de D-sérine et ISDN en comportement n'a pas modifié le seuil de retrait facial des animaux testés 2 heures plus tard. Ce résultat suggère que l'activité astrocytaire n'est pas le seul acteur impliqué dans la sensibilisation centrale trigéminal. De plus, le L α AA, bloquant complètement l'activité des astrocytes, va aussi altérer les fonctions physiologiques importantes astrocytaires comme la recapture de glutamate, et ainsi augmenter la transmission du message nociceptif.

VII. Gliotransmission D-sérinergique et sensibilisation trigéminal ISDN-induite

De nombreuses études ont pu montrer l'implication de la D-sérine dans la sensibilisation centrale spinale (Choi et al., 2017b; Lefèvre et al., 2015; Moon et al., 2015) et trigéminal (Dieb and Hafidi, 2013; Miraucourt et al., 2011) dans différents modèles de douleurs. Nos résultats ont montré que la sensibilisation des neurones WDR par l'ISDN passait par une augmentation du wind-up de la réponse C. Cette plasticité à court terme des neurones trigéminaux est dépendante en grande partie de l'activation des récepteurs NMDA (Coste et al. 2008) dont un des co-agonistes est la D-Sérine astrocytaire (Mothet et al., 2000; Panatier et al., 2006). Ces éléments suggèrent que l'effet anti-allodynique dû au blocage de l'activité astrocytaire par le L α AA est la conséquence d'une inhibition de la libération de D-sérine et donc une diminution de l'activation des récepteurs NMDA.

En utilisant la DAAO, enzyme de dégradation de la D-sérine, en traitement préventif à une dose de 0,17 U, nous avons montré, comme pour le L α AA, un blocage de l'aggravation de l'amplitude de l'allodynie après la 5^{ème} injection d'ISDN et un blocage de la sensibilisation centrale des neurones WDR du Sp5C induite dans le même contexte. La prévention de l'aggravation de l'allodynie par la DAAO est comparable à l'effet rapporté par d'autres études (Choi et al., 2017a, 2017b; Dieb and Hafidi, 2013; Moon et al., 2015), notamment dans un modèle d'allodynie faciale par désinhibition glycinergique (Miraucourt et al., 2011). Comme pour le L α AA, le traitement par la DAAO ne permet pas un retour à un seuil nociceptif normal. Il a été montré par Mothet et collaborateurs, lors d'une étude in vitro, que même en l'absence de D-sérine, demeure une activité résiduelle du récepteur NMDA, interprétée comme le

résultat de la présence en plus faible concentration de glycine, l'autre co-agoniste du récepteur (Mothet et al., 2000).

VIII. Mécanismes de mise en jeu des astrocytes

L'ISDN libère du NO qui est un agent extrêmement diffusible passant facilement la barrière hémato-encéphalique. De par sa réactivité importante et sa demi-vie courte, le NO va agir principalement sur les éléments à proximité (Coneski and Schoenfish, 2012). Les prolongements astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins, se trouvent donc au contact direct avec le NO libéré par les métabolites actifs de l'ISDN. Par ailleurs, des études réalisées sur des astrocytes en culture ont montré que le NO était capable de provoquer une augmentation du calcium intracellulaire des astrocytes, et générer des vagues calciques se propageant entre les astrocytes (Willmott et al., 2000) *via* la voie GMP-cyclique / Protéine Kinase G. Le NO est aussi capable par la même voie de réguler l'expression de GFAP (Brahmachari et al., 2006).

Dans un modèle de douleur post-herpétique, il a été montré que l'allodynie mécanique était dépendante de l'activité astrocytaire comme le montre une augmentation de GFAP et un blocage de l'allodynie par le L α AA. De plus, les résultats montrent que cette activation astrocytaire est dépendante du NO et plus précisément de l'activité de la nitric oxyde synthase inducible (iNOS) (Zhang et al., 2011b). Ainsi, *in vivo*, le NO peut activer les astrocytes *via* la voie du GMPc et contribuer ainsi aux mécanismes de sensibilisation centrale en favorisant la libération de gliotransmetteurs comme la D-Sérine et/ou le glutamate.

Par ailleurs, il a été montré que l'allodynie provoquée par des injections répétées de nitroglycérine chez le rat, dépendait de l'activation de la guanylate cyclase soluble (sGC*), activée par le NO (Ben Aissa et al., 2018). En effet, l'injection d'un peptide activateur spécifique de la sGC, le VL-102, entraîne des effets similaires à ceux de l'injection de NTG, à savoir une allodynie mécanique céphalique qui devient persistante en cas d'injections répétées. De manière intéressante, l'étude de la biodisponibilité de ce peptide a montré un passage de la BHE, suggérant l'intervention de mécanismes centraux. (Ben Aissa et al., 2018).

Ces données sont à relier avec celles obtenues chez l'homme. Le Sildénafil (inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5, augmentant la concentration en GMPc) est capable d'induire une crise de migraine sans pour autant entraîner de vasodilatation méningée

(Kruuse et al., 2003), montrant l'importance de la voie GMPc indépendamment de son effet vasculaire dans la sensibilisation trigéminal.

A la lumière de ces données, nous pouvons suggérer qu'une activation des astrocytes par le NO au niveau central constitue un des mécanismes responsables de la sensibilisation centrale trigéminal à l'origine de l'allodynie migraineuse. Cependant, nous ne pouvons pas exclure le fait que le NO peut aussi activer les neurones via le GMPc au niveau pré- et post-synaptique et donc augmenter la réponse neuronale indépendamment des astrocytes (Garthwaite, 2008).

Conclusion

L'ensemble du travail présenté ici a permis d'atteindre 2 objectifs permettant de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques dans un contexte de migraine chronique.

Premièrement, nos travaux ont permis de mieux caractériser le modèle de migraine par injection répétée d'un donneur de NO (ISDN) chez le rat. Ainsi, nous avons complété les données de la littérature (Dallel et al., 2017) en montrant chez la femelle une allodynie mécanique cutanée faciale qui devient persistante avec la répétition des injections d'ISDN. Cette allodynie s'accompagne d'une sensibilisation centrale des neurones des couches superficielles du Sp5C, comme le montre la surexpression de la protéine p-ERK.

Nous avons montré en condition chronique une sensibilisation centrale des neurones WDR du Sp5C, plus importante en termes de proportion de neurones impliqués et d'intensité par rapport à une condition aiguë, traduisant une progression de la sensibilisation centrale du système trigéminal. Ces résultats sont en accord avec les dernières théories sur les mécanismes de transformation de la migraine, où la répétition des crises va activer de façon soutenue les structures centrales (Aurora and Brin, 2017; May and Schulte, 2016). Cette sensibilisation des neurones du Sp5C se traduit par la modification des réponses C, *via* une augmentation l'input C et du wind-up. L'altération des contrôles descendants inhibiteurs (CIDN) ne semble pas un élément contribuant à la progression de cette sensibilisation induite par l'ISDN, puisqu'ils ne sont altérés qu'après un certain délai et de façon transitoire lors de la dernière injection d'ISDN. Enfin, nous avons rapporté une différence de l'effet de la répétition de l'ISDN sur les neurones à champs cutanés de ceux à champs mixtes (méningés). Notre étude est la première à différencier les neurones WDR en fonction de leurs afférences, et la sensibilisation plus importante de la population purement cutanée en condition chronique remet en question une origine méningée dans les effets du NO dans notre modèle de migraine. Il semble en tout cas que d'autres mécanismes sont impliqués, de manière importante, dans la sensibilisation trigéminal.

Deuxièmement, comme cela avait été suggéré par Bartley 2009 (« Could glia be a factor in migraine ? »), nous avons pour la première fois, montré que l'allodynie cutanée faciale et la sensibilisation centrale associée, dans ce modèle de migraine chronique, dépend de l'activation astrocytaire. En effet, d'une part la répétition ISDN provoque une sur-

expression de la GFAP au niveau du Sp5C, et d'autre part l'hypersensibilité faciale ainsi que la sensibilisation centrale des neurones du Sp5C sont inhibées par le blocage du métabolisme astrocytaire. Nous avons montré que la libération du gliotransmetteur D-Sérine (co-agoniste des récepteurs NMDA) est un des mécanismes à l'origine de la sensibilisation centrale trigéminale. Ainsi, nos travaux sont en faveur et appuient l'hypothèse selon laquelle un donneur de NO comme l'ISDN induit l'activation des astrocytes, soit directement via l'activation la voie du GMPc, soit indirectement via l'activation d'autres types cellulaire activant en retour les astrocytes. Les astrocytes par la libération de D-Sérine, dans ces conditions pathologiques, augmentent l'activation des récepteurs NMDA neuronaux à l'origine de la sensibilisation centrale trigéminale et de l'allodynie faciale.

Ces travaux apportent, pour la première fois, dans un modèle de migraine par donneur de NO, des preuves de l'implication des astrocytes dans la physiopathologie de la migraine. L'intervention d'un mécanisme d'action astrocytaire, via la modulation synaptique glutamatergique par la D-Sérine, permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques. La compréhension de la physiopathologie de la migraine et l'amélioration des thérapeutiques ne doit pas être abordée, à l'instar d'autres douleurs, que par le seul angle neuronal. Nos données montrent que l'altération du dialogue neurones/astrocytes est un élément déterminant dans la progression de la migraine.

Perspectives

Afin de consolider et compléter nos données un certain nombre de compléments s'avèrent nécessaires à court et moyen terme pour enrichir nos connaissances plus approfondie du rôle des astrocytes dans la physiopathologie migraineuse.

Analyser le déroulement temporel de l'activation astrocytaire

Notre principal résultat est une augmentation de la surface marquée GFAP+ en condition ISDN-5 par rapport aux contrôles. Ce résultat nécessite d'être complété en caractérisant la dynamique de cette réactivité astrocytaire, en évaluant le marquage GFAP+ à différents temps (Après ISDN-1, entre ISDN-1 et ISDN-4, avant ISDN-5), afin de savoir si la persistance de l'allodynie est associée à une activation chronique des astrocytes.

Identifier les voies de signalisations astrocytaires impliquées dans l'effet ISDN

Nous avons tenté de mieux caractériser l'activation astrocytaire en tendant d'identifier une des voies de signalisation pouvant être activée dans nos conditions expérimentales. Nous avons montré que la voie p-ERK n'était pas activée dans les astrocytes, puisque nous n'avons pas de colocalisation p-ERK/Sox9. De nombreuses études ont montré que la voie p-JNK était préférentiellement active dans les astrocytes en condition de douleur neuropathique notamment (Gao et al., 2010; Manassero et al., 2012; Zhuang et al., 2006). Nous avons tenté de réaliser le co-marquage GFAP/p-JNK dans le Sp5C, pour l'instant sans succès. Le travail devra être reconduit pour mieux comprendre les voies de signalisations intracellulaires impliquées dans la réactivité des astrocytes.

Nous avons également fait l'hypothèse que l'action de l'ISDN passait par l'activation de la voie GMPc au niveau des astrocytes et/ou neurones. Un co-marquage de l'enzyme Guanylate Cyclase soluble avec GFAP ou NeuN permettrait d'apporter un élément de compréhension de la sensibilisation astrocytaire et/ou neuronale par l'ISDN.

Evaluer les effets d'un traitement de fond par inhibition astrocytaire

L'application intracisternale des agents inhibiteurs astrocytaires a montré son efficacité dans le blocage de l'allodynie de « crise », c'est-à-dire de la baisse du seuil mécanique facial après la 5ème injection d'ISDN, mais est sans effet sur l'allodynie persistante. Afin de savoir si cette allodynie persistante relève de mécanismes astrocytaires, il convient d'administrer des injections de DAAO comme un traitement de fond avant chaque injection d'ISDN et de suivre l'évolution de la sensibilité céphalique. Nous pourrions ainsi étudier si cette allodynie est retardée ou bien bloquée.

Vérifier l'origine astrocytaire de la D-sérine dans le modèle.

Comme énoncé dans l'introduction, un débat sur l'origine de la D-sérine est actuellement en cours au sein de la communauté scientifique. En effet les travaux de Wolosker et collaborateurs en 2016 ont remis en cause son origine astrocytaire. Toutefois, l'origine astrocytaire dans les conditions pathologiques comme dans les douleurs chroniques est reconnue. Dans le contexte ISDN présent, nos résultats montrant le rétablissement de l'allodynie mécanique après avoir ajouté de la D-sérine en présence de gliotoxine est un argument sur une origine astrocytaire de la D-sérine. Malgré tout, une confirmation de ce résultat reste nécessaire. Pour ce faire nous proposons de tester le modèle ISDN répété chez la souche de souris Knock-Out pour le gène codant la sérine racémase (*Srr* -/-) sous le contrôle du promoteur de GFAP.

L'allodynie analysée dans notre travail est considérée comme un marqueur de progression de la migraine (Bigal et al., 2008; Louter et al., 2013). Il n'en est pas moins un symptôme de cette pathologie. Ainsi, à plus long terme, il conviendra d'étudier le rôle et l'implication de l'activité astrocytaire dans les autres symptômes de la migraine.

Evaluer le rôle des astrocytes sur la douleur spontanée

La migraine est avant tout reconnue comme une douleur céphalique spontanée d'intensité modérée à sévère et de durée variable selon les crises. Chez le rat il est possible de détecter la douleur spontanée en analysant les expressions faciales selon la « Rat Grimace Scale » mise au point par l'équipe de J Mogil en 2011 (Sotocinal et al., 2011). Nous proposons d'appliquer le même protocole d'étude de l'activité astrocytaire en mesurant les effets sur les

variations d'expression faciales comme l'ouverture orbitaire, la fronçure faciale ou encore l'orientation des oreilles et des vibrisses.

Evaluer le rôle des astrocytes sur la photophobie et/ou phonophobie

De la même façon, il sera intéressant d'analyser l'impact de l'inhibition astrocytaire sur les hypersensibilités à la lumière et aux sons qui font partie des signes associés à la céphalée migraineuse. Ainsi la photophobie pourra être évaluée chez le rat par le test de préférence de place et la phonophobie par le test du sursaut (Startle reflex) qui ont montré leur sensibilité dans les modèles de migraine (Mason et al., 2017; Oshinsky et al., 2012)

Evaluer le rôle des astrocytes dans d'autres modèles

Pour consolider nos résultats et attester de l'implication et du rôle des astrocytes dans la progression de la migraine, il est indispensable de mesurer l'impact de l'inhibition astrocytaire sur l'allodynie mécanique et la sensibilisation centrale du Sp5C avec un autre modèle. En effet, l'injection répétée d'ISDN est considérée comme un modèle vasculaire faisant écho à la théorie vasculaire de la migraine. La migraine est aussi sous-tendue à des phénomènes inflammatoires (théorie inflammatoire). Ainsi, le rôle des astrocytes pourra être analysé avec le modèle par injection répétée de soupe inflammatoire au niveau méningé, qui présente des caractéristiques équivalentes au modèle ISDN (allodynie, sensibilisation centrale du Sp5C...)

Références bibliographiques

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.

Abdallah, K., Monconduit, L., Artola, A., Luccarini, P., and Dallel, R. (2015). GABAergic inhibition or dopamine denervation of the A11 hypothalamic nucleus induces trigeminal analgesia. *Pain* 156, 644–655.

Adrian, E.K., Williams, M.G., and George, F.C. (1978). Fine structure of reactive cells in injured nervous tissue labeled with 3H-thymidine injected before injury. *J. Comp. Neurol.* 180, 815–839.

Afridi, S.K., Kaube, H., and Goadsby, P.J. (2004). Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain* 110, 675–680.

Aira, Z., Buesa, I., Salgueiro, M., Bilbao, J., Aguilera, L., Zimmermann, M., and Azkue, J.J. (2010). Subtype-specific changes in 5-HT receptor-mediated modulation of C fibre-evoked spinal field potentials are triggered by peripheral nerve injury. *Neuroscience* 168, 831–841.

Aira, Z., Buesa, I., Gallego, M., García del Caño, G., Mendiabale, N., Mingo, J., Rada, D., Bilbao, J., Zimmermann, M., and Azkue, J.J. (2012). Time-dependent cross talk between spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor and mGluR1 subserves spinal hyperexcitability and neuropathic pain after nerve injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 13568–13581.

Aira, Z., Buesa, I., García del Caño, G., Bilbao, J., Doñate, F., Zimmermann, M., and Azkue, J.J. (2013). Transient, 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: Up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons. *Pain* 154, 1865–1877.

Akerman, S., Holland, P.R., Summ, O., Lasalandra, M.P., and Goadsby, P.J. (2012). A translational in vivo model of trigeminal autonomic cephalalgias: therapeutic characterization. *Brain J. Neurol.* 135, 3664–3675.

Akerman, S., Karsan, N., Bose, P., Hoffmann, J.R., Holland, P.R., Romero-Reyes, M., and Goadsby, P.J. (2019). Nitroglycerine triggers triptan-responsive cranial allodynia and trigeminal neuronal hypersensitivity. *Brain J. Neurol.* 142, 103–119.

Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 117, 145–152.

Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., Lanerolle, N.C. de, Nagelhus, E.A., Adams, M.E., Froehner, S.C., Agre, P., and Ottersen, O.P. (2003). Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: Phenotypic defects in brains of α -syntrophin-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13615–13620.

Andrew, D., Krout, K.E., and Craig, A.D.B. (2003). Differentiation of lamina I spinomedullary and spinothalamic neurons in the cat. *J. Comp. Neurol.* 458, 257–271.

Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., and Haydon, P.G. (1998). Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 6822–6829.

- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Arbab, M.A., Wiklund, L., and Svendgaard, N.A. (1986). Origin and distribution of cerebral vascular innervation from superior cervical, trigeminal and spinal ganglia investigated with retrograde and anterograde WGA-HRP tracing in the rat. *Neuroscience* 19, 695–708.
- Asghar, M.S., Hansen, A.E., Amin, F.M., Geest, R.J. van der, Koning, P. van der, Larsson, H.B.W., Olesen, J., and Ashina, M. (2011). Evidence for a vascular factor in migraine. *Ann. Neurol.* 69, 635–645.
- Ashina, M., Hansen, J.M., Do, T.P., Melo-Carrillo, A., Burstein, R., and Moskowitz, M.A. (2019). Migraine and the trigeminovascular system—40 years and counting. *Lancet Neurol.*
- Ashina, S., Serrano, D., Lipton, R.B., Maizels, M., Manack, A.N., Turkel, C.C., Reed, M.L., and Buse, D.C. (2012). Depression and risk of transformation of episodic to chronic migraine. *J. Headache Pain* 13, 615–624.
- Aston-Jones, G., and Waterhouse, B. (2016). Locus coeruleus: From global projection system to adaptive regulation of behavior. *Brain Res.* 1645, 75–78.
- Aurora, S.K., and Brin, M.F. (2017). Chronic Migraine: An Update on Physiology, Imaging, and the Mechanism of Action of Two Available Pharmacologic Therapies. *Headache* 57, 109–125.
- Avona, A., Burgos-Vega, C., Burton, M.D., Akopian, A., Price, T.J., and Dussor, G. (2019). Dural calcitonin gene-related peptide produces female-specific responses in rodent migraine models. *J. Neurosci.* 0364–19.
- Azkue, J.J., Liu, X.-G., Zimmermann, M., and Sandkühler, J. (2003). Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *Pain* 106, 373–379.
- Badreldin, I.S., El-Kholy, D.S., and Elwakil, A.A. (2012). Harmonic adaptive noise canceler for electrocardiography with no power-line reference. In 2012 16th IEEE Mediterranean Electrotechnical Conference, pp. 1017–1020.
- Baldacci, F., Vedovello, M., Ulivi, M., Vergallo, A., Poletti, M., Borelli, P., Nuti, A., and Bonuccelli, U. (2013). How aware are migraineurs of their triggers? *Headache* 53, 834–837.
- Balu, D.T., Takagi, S., Puhl, M.D., Benneyworth, M.A., and Coyle, J.T. (2014). D-serine and serine racemase are localized to neurons in the adult mouse and human forebrain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 34, 419–435.
- Balu, D.T., Pantazopoulos, H., Huang, C.C.Y., Muszynski, K., Harvey, T.L., Uno, Y., Rorabaugh, J.M., Galloway, C.R., Botz-Zapp, C., Berretta, S., et al. (2019). Neurotoxic astrocytes express the d-serine synthesizing enzyme, serine racemase, in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Dis.* 130, 104511.
- Bartley, J. (2009). Could glial activation be a factor in migraine? *Med. Hypotheses* 72, 255–257.

- Baskin, S.M., Lipchik, G.L., and Smitherman, T.A. (2006). Mood and anxiety disorders in chronic headache. *Headache* 46 Suppl 3, S76-87.
- Bates, E.A., Nikai, T., Brennan, K.C., Fu, Y.-H., Charles, A.C., Basbaum, A.I., Ptáček, L.J., and Ahn, A.H. (2010). Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia Int. J. Headache* 30, 170–178.
- Bazargani, N., and Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat. Neurosci.* 19, 182–189.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A.A., Siklos, L., McKercher, S.R., and Appel, S.H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16021–16026.
- Beggs, S., Trang, T., and Salter, M.W. (2012). P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 15, 1068–1073.
- Beitz, A.J. (1982a). The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 7, 133–159.
- Beitz, A.J. (1982b). The nuclei of origin of brain stem enkephalin and substance P projections to the rodent nucleus raphe magnus. *Neuroscience* 7, 2753–2768.
- Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J.W., and Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 77, 87–97.
- Ben Aissa, M., Tipton, A.F., Bertels, Z., Gandhi, R., Moye, L.S., Novack, M., Bennett, B.M., Wang, Y., Litosh, V., Lee, S.H., et al. (2018). Soluble guanylyl cyclase is a critical regulator of migraine-associated pain. *Cephalalgia* 38, 1471–1484.
- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K., and Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
- Bennett, M.V.L., Contreras, J.E., Bukauskas, F.F., and Sáez, J.C. (2003). New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26, 610–617.
- Benneworth, M.A., Li, Y., Basu, A.C., Bolshakov, V.Y., and Coyle, J.T. (2012). Cell selective conditional null mutations of serine racemase demonstrate a predominate localization in cortical glutamatergic neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 613–624.
- Bernstein, C., and Burstein, R. (2012). Sensitization of the trigeminovascular pathway: perspective and implications to migraine pathophysiology. *J. Clin. Neurol. Seoul Korea* 8, 89–99.
- Berridge, C.W., and Waterhouse, B.D. (2003). The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Rev.* 42, 33–84.

- Bigal, M.E., and Lipton, R.B. (2008). Clinical course in migraine: conceptualizing migraine transformation. *Neurology* 71, 848–855.
- Bigal, M.E., Serrano, D., Buse, D., Scher, A., Stewart, W.F., and Lipton, R.B. (2008). Acute migraine medications and evolution from episodic to chronic migraine: a longitudinal population-based study. *Headache* 48, 1157–1168.
- Bindocci, E., Savtchouk, I., Liaudet, N., Becker, D., Carriero, G., and Volterra, A. (2017). Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science* 356, eaai8185.
- Bingham, S., Davey, P.T., Babbs, A.J., Irving, E.A., Sammons, M.J., Wyles, M., Jeffrey, P., Cutler, L., Riba, I., Johns, A., et al. (2001). Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain* 92, 81–90.
- Björck, Åke. (1996). *Numerical Methods for Least Squares Problems* (Society for Industrial and Applied Mathematics).
- Boitano, S., Dirksen, E.R., and Sanderson, M.J. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 258, 292–295.
- Bolay, H., Reuter, U., Dunn, A.K., Huang, Z., Boas, D.A., and Moskowitz, M.A. (2002). Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* 8, 136.
- Bouhassira, D., Villanueva, L., Bing, Z., and le Bars, D. (1992). Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Res.* 595, 353–357.
- Bowdler, I., Kilian, J., and Gänsslen-Blumberg, S. (1988). The Association Between Analgesic Abuse and Headache — Coincidental or Causal? *Headache J. Head Face Pain* 28, 494–494.
- Bowyer, S.M., Aurora, K.S., Moran, J.E., Tepley, N., and Welch, K.M. (2001). Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Ann. Neurol.* 50, 582–587.
- Boyer, N., Dallel, R., Artola, A., and Monconduit, L. (2014). General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression. *Pain* 155, 1196–1205.
- Boyer, N., Signoret-Genest, J., Artola, A., Dallel, R., and Monconduit, L. (2017). Propranolol treatment prevents chronic central sensitization induced by repeated dural stimulation. *Pain* 158, 2025–2034.
- Brahmachari, S., Fung, Y.K., and Pahan, K. (2006). Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *J. Neurosci.* 26, 4930–4939.
- Brandes, J.L. (2006). The Influence of Estrogen on Migraine: A Systematic Review. *JAMA* 295, 1824–1830.

- Breslau, N., Schultz, L.R., Stewart, W.F., Lipton, R.B., Lucia, V.C., and Welch, K.M. (2000). Headache and major depression: is the association specific to migraine? *Neurology* 54, 308–313.
- Buesa, I., Ortiz, V., Aguilera, L., Torre, F., Zimmermann, M., and Azkue, J.J. (2006). Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 50, 585–594.
- Buesa, I., Urrutia, A., Aira, Z., Salgueiro, M., Bilbao, J., Mozas, M., Aguilera, L., Zimmermann, M., and Azkue, J.J. (2008). Depression of C fibre-evoked spinal field potentials by the spinal delta opioid receptor is enhanced in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain: involvement of the mu-subtype. *Neuropharmacology* 55, 1376–1382.
- Burstein, R., and Jakubowski, M. (2004). Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization. *Ann. Neurol.* 55, 27–36.
- Burstein, R., and Jakubowski, M. (2009). Neural substrate of depression during migraine. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 30 *Suppl* 1, S27-31.
- Burstein, R., Dado, R.J., and Giesler, G.J. (1990). The cells of origin of the spinothalamic tract of the rat: a quantitative reexamination. *Brain Res.* 511, 329–337.
- Burstein, R., Yamamura, H., Malick, A., and Strassman, A.M. (1998). Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J. Neurophysiol.* 79, 964–982.
- Burstein, R., Jakubowski, M., Garcia-Nicas, E., Kainz, V., Bajwa, Z., Hargreaves, R., Becerra, L., and Borsook, D. (2010). Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann. Neurol.* 68, 81–91.
- Buse, D.C., Manack, A.N., Fanning, K.M., Serrano, D., Reed, M.L., Turkel, C.C., and Lipton, R.B. (2012). Chronic migraine prevalence, disability, and sociodemographic factors: results from the American Migraine Prevalence and Prevention Study. *Headache* 52, 1456–1470.
- Buse, D.C., Silberstein, S.D., Manack, A.N., Papapetropoulos, S., and Lipton, R.B. (2013). Psychiatric comorbidities of episodic and chronic migraine. *J. Neurol.* 260, 1960–1969.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- Cairns, B.E., Arendt-Nielsen, L., and Sacerdote, P. (2015). Perspectives in Pain Research 2014: Neuroinflammation and glial cell activation: The cause of transition from acute to chronic pain? *Scand. J. Pain* 6, 3–6.
- Calvo, M., and Bennett, D.L.H. (2012). The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Exp. Neurol.* 234, 271–282.

Capuani, C., Melone, M., Tottene, A., Bragina, L., Crivellaro, G., Santello, M., Casari, G., Conti, F., and Pietrobon, D. (2016). Defective glutamate and K⁺ clearance by cortical astrocytes in familial hemiplegic migraine type 2. *EMBO Mol. Med.* *8*, 967–986.

Chabriat, H., Joire, J.E., Danchot, J., Gripon, P., and Bousser, M.G. (1994). Combined oral lysine acetylsalicylate and metoclopramide in the acute treatment of migraine: a multicentre double-blind placebo-controlled study. *Cephalalgia Int. J. Headache* *14*, 297–300.

Chai, N.C., Peterlin, B.L., and Calhoun, A.H. (2014a). Migraine and estrogen. *Curr. Opin. Neurol.* *27*, 315–324.

Chai, N.C., Scher, A.I., Moghekar, A., Bond, D.S., and Peterlin, B.L. (2014b). Obesity and headache: part I--a systematic review of the epidemiology of obesity and headache. *Headache* *54*, 219–234.

Chai, N.C., Bond, D.S., Moghekar, A., Scher, A.I., and Peterlin, B.L. (2014c). Obesity and headache: Part II--potential mechanism and treatment considerations. *Headache* *54*, 459–471.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* *53*, 55–63.

Chapman, V., Suzuki, R., and Dickenson, A.H. (1998). Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-L6. *J. Physiol.* *507*, 881–894.

Charbit, A.R., Akerman, S., Holland, P.R., and Goadsby, P.J. (2009). Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: an electrophysiological and immunohistochemical study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 12532–12541.

Chen, W.-T., Hsiao, F.-J., Ko, Y.-C., Liu, H.-Y., Wang, P.-N., Fuh, J.-L., Lin, Y.-Y., and Wang, S.-J. (2018). Comparison of Somatosensory Cortex Excitability Between Migraine and “Strict-Criteria” Tension-Type Headache: A Magnetoencephalographic Study. *Pain*.

Cherry, J.D., Olschowka, J.A., and O’Banion, M.K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* *11*, 98.

Chiang, C.-Y., Wang, J., Xie, Y.-F., Zhang, S., Hu, J.W., Dostrovsky, J.O., and Sessle, B.J. (2007). Astroglial Glutamate–Glutamine Shuttle Is Involved in Central Sensitization of Nociceptive Neurons in Rat Medullary Dorsal Horn. *J. Neurosci.* *27*, 9068–9076.

Chimene, M.F., and Pallas-Areny, R. (2000). A comprehensive model for power line interference in biopotential measurements. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* *49*, 535–540.

Choi, H.-S., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Choi, S.-R., Kwon, S.-G., Kang, S.-Y., Moon, J.-Y., Han, H.-J., Beitz, A.J., and Lee, J.-H. (2017a). Differential involvement of ipsilateral and contralateral spinal cord astrocyte D-serine in carrageenan-induced mirror-image pain: role of sigma-1 receptors and astrocyte gap junctions. *Br. J. Pharmacol.*

Choi, S.-R., Moon, J.-Y., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Kwon, S.-G., Choi, H.-S., Kang, S.-Y., Han, H.-J., Beitz, A.J., and Lee, J.-H. (2017b). Spinal D-Serine Increases PKC-Dependent GluN1 Phosphorylation Contributing to the Sigma-1 Receptor-Induced Development of Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *18*, 415–427.

Cholet, N., Pellerin, L., Magistretti, P.J., and Hamel, E. (2002). Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺,K⁺-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *12*, 515–525.

Clements, J.D., and Bekkers, J.M. (1997). Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template. *Biophys. J.* *73*, 220–229.

Coneski, P.N., and Schoenfisch, M.H. (2012). Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting. *Chem. Soc. Rev.* *41*, 3753.

Cornelison, L.E., Hawkins, J.L., and Durham, P.L. (2016). Elevated levels of calcitonin gene-related peptide in upper spinal cord promotes sensitization of primary trigeminal nociceptive neurons. *Neuroscience* *339*, 491–501.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* *247*, 470–473.

Coste, J., Voisin, D.L., Miraucourt, L.S., Dallel, R., and Luccarini, P. (2008). Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain* *137*, 340–351.

Couturier, E.G.M., Bomhof, M. a. M., Neven, A.K., and Duijn, N.V. (2003). Menstrual migraine in a representative Dutch population sample: prevalence, disability and treatment. *Cephalalgia* *23*, 302–308.

Craig, A.D. (1992). Spinal and trigeminal lamina I input to the locus coeruleus anterogradely labeled with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat and the monkey. *Brain Res.* *584*, 325–328.

Crissman, R.S., Sodeman, T., Denton, A.M., Warden, R.J., Siciliano, D.A., and Rhoades, R.W. (1996). Organization of primary afferent axons in the trigeminal sensory root and tract of the rat. *J. Comp. Neurol.* *364*, 169–183.

Dalgaard, E., Auken, E., and Larsen, J.J. (2012). Adaptive noise cancelling of multichannel magnetic resonance sounding signals. *Geophys. J. Int.* *191*, 88–100.

Dallel, R., Ricard, O., and Raboisson, P. (2004). Organization of parabrachial projections from the spinal trigeminal nucleus oralis: An anterograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* *470*, 181–191.

Dallel, R., Descheemaeker, A., and Luccarini, P. (2017). Recurrent administration of the nitric oxide donor, isosorbide dinitrate, induces a persistent cephalic cutaneous hypersensitivity: A model for migraine progression. *Cephalalgia Int. J. Headache* *333102417714032*.

Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* *65*, 1–105.

Date, Y., Mondal, M.S., Matsukura, S., and Nakazato, M. (2000). Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 288, 87–90.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.

Davis, K.D., and Dostrovsky, J.O. (1988). Responses of feline trigeminal spinal tract nucleus neurons to stimulation of the middle meningeal artery and sagittal sinus. *J. Neurophysiol.* 59, 648–666.

Denker, M., Roux, S., Lindén, H., Diesmann, M., Riehle, A., and Grün, S. (2011). The local field potential reflects surplus spike synchrony. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 21, 2681–2695.

Derry, S., and Moore, R.A. (2013). Paracetamol (acetaminophen) with or without an antiemetic for acute migraine headaches in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008040.

Di Stefano, A., Scaglione, A., and Giaconia, C. (2005). Efficient FPGA implementation of an adaptive noise canceller. pp. 87–89.

Dickenson, A.H., Chapman, V., and Green, G.M. (1997). The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen. Pharmacol.* 28, 633–638.

Dieb, W., and Hafidi, A. (2013). Astrocytes are involved in trigeminal dynamic mechanical allodynia: potential role of D-serine. *J. Dent. Res.* 92, 808–813.

Diener, H.-C. (2003). Rpr100893, A Substance-P Antagonist, is Not Effective in the Treatment of Migraine Attacks. *Cephalalgia* 23, 183–185.

Diener, H.C., Dodick, D.W., Aurora, S.K., Turkel, C.C., DeGryse, R.E., Lipton, R.B., Silberstein, S.D., Brin, M.F., and PREEMPT 2 Chronic Migraine Study Group (2010). OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 2 trial. *Cephalalgia Int. J. Headache* 30, 804–814.

Do, T.P., Hvedstrup, J., and Schytz, H.W. (2018). Botulinum toxin: A review of the mode of action in migraine. *Acta Neurol. Scand.* 137, 442–451.

Dobrev, D., Neycheva, T., and Mudrov, N. (2008). Digital lock-in techniques for adaptive power-line interference extraction. *Physiol. Meas.* 29, 803–816.

Donegan, M., Kernisant, M., Cua, C., Jasmin, L., and Ohara, P.T. (2013). Satellite glial cell proliferation in the trigeminal ganglia after chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *Glia* 61, 2000–2008.

Drdla, R., and Sandkühler, J. (2008). Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo. *Mol. Pain* 4, 18.

dubner, R. (1967). Interaction of peripheral and central input in the main sensory trigeminal nucleus of the cat. *Exp. Neurol.* 17, 186–202.

- Ducourneau, V.R.R., Dolique, T., Hachem-Delaunay, S., Miraucourt, L.S., Amadio, A., Blaszczyk, L., Jacquot, F., Ly, J., Devoize, L., Oliet, S.H.R., et al. (2014). Cancer pain is not necessarily correlated with spinal overexpression of reactive glia markers. *Pain* 155, 275–291.
- Edelmayer, R.M., Vanderah, T.W., Majuta, L., Zhang, E.-T., Fioravanti, B., De Felice, M., Chichorro, J.G., Ossipov, M.H., King, T., Lai, J., et al. (2009). Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. *Ann. Neurol.* 65, 184–193.
- Edvinsson, L., and Warfvinge, K. (2019). Recognizing the role of CGRP and CGRP receptors in migraine and its treatment. *Cephalalgia Int. J. Headache* 39, 366–373.
- Einevoll, G.T., Kayser, C., Logothetis, N.K., and Panzeri, S. (2013). Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 770–785.
- Eising, E., de Leeuw, C., Min, J.L., Anttila, V., Verheijen, M.H., Terwindt, G.M., Dichgans, M., Freilinger, T., Kubisch, C., International Headache Genetics Consortium, et al. (2016). Involvement of astrocyte and oligodendrocyte gene sets in migraine. *Cephalalgia Int. J. Headache* 36, 640–647.
- Ellrich, J., Ulucan, C., and Schnell, C. (2000). Are “neutral cells” in the rostral ventro-medial medulla subtypes of on- and off-cells? *Neurosci. Res.* 38, 419–423.
- Ennis, M., Aston-Jones, G., and Shiekhhattar, R. (1992). Activation of locus coeruleus neurons by nucleus paragigantocellularis or noxious sensory stimulation is mediated by intracoerulear excitatory amino acid neurotransmission. *Brain Res.* 598, 185–195.
- Evers, S., and Marziniak, M. (2010). Clinical features, pathophysiology, and treatment of medication-overuse headache. *Lancet Neurol.* 9, 391–401.
- Fan, W., Zhu, X., He, Y., Zhu, M., Wu, Z., Huang, F., and He, H. (2019). The role of satellite glial cells in orofacial pain. *J. Neurosci. Res.* 97, 393–401.
- Faubion, S.S., Batur, P., and Calhoun, A.H. (2018). Migraine Throughout the Female Reproductive Life Cycle. *Mayo Clin. Proc.* 93, 639–645.
- Ferrari, L.F., Levine, J.D., and Green, P.G. (2016). Mechanisms mediating nitroglycerin-induced delayed-onset hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 317, 121–129.
- Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2004). Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 722–732.
- Fields, H.L., Malick, A., and Burstein, R. (1995). Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.* 74, 1742–1759.
- Flint, R.D., Lindberg, E.W., Jordan, L.R., Miller, L.E., and Slutzky, M.W. (2012). Accurate decoding of reaching movements from field potentials in the absence of spikes. *J. Neural Eng.* 9, 046006.

Flores Ramos, J.M., Devoize, L., Descheemaeker, A., Molat, J.-L., Luccarini, P., and Dallel, R. (2017). The nitric oxide donor, isosorbide dinitrate, induces a cephalic cutaneous hypersensitivity, associated with sensitization of the medullary dorsal horn. *Neuroscience* 344, 157–166.

Foley, J.C., McIver, S.R., and Haydon, P.G. (2011). Gliotransmission modulates baseline mechanical nociception. *Mol. Pain* 7, 93.

François, A., Low, S.A., Sypek, E.I., Christensen, A.J., Sotoudeh, C., Beier, K.T., Ramakrishnan, C., Ritola, K.D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., et al. (2017). A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron* 93, 822–839.e6.

Fritschy, J.M., and Grzanna, R. (1990). Distribution of locus coeruleus axons within the rat brainstem demonstrated by Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tracing in combination with dopamine-beta-hydroxylase immunofluorescence. *J. Comp. Neurol.* 293, 616–631.

Gao, Y.-J., Zhang, L., Samad, O.A., Suter, M.R., Yasuhiko, K., Xu, Z.-Z., Park, J.-Y., Lind, A.-L., Ma, Q., and Ji, R.-R. (2009). JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4096–4108.

Gao, Y.-J., Xu, Z.-Z., Liu, Y.-C., Wen, Y.-R., Decosterd, I., and Ji, R.-R. (2010). The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition. *Pain* 148, 309–319.

Garrison, C.J., Dougherty, P.M., Kajander, K.C., and Carlton, S.M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 565, 1–7.

Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2783–2802.

Gauriau, C., and Bernard, J.-F. (2002). Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* 87, 251–258.

Geng, X., Wang, X., He, F., Zhang, X., Xie, J., Gao, G., Han, H., Yao, X., Zhang, H., Gao, Y., et al. (2019). Spike and Local Field Synchronization Between the Pedunculopontine Nucleus and Primary Motor Cortex in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience* 404, 470–483.

Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 87–99.

Goadsby, P.J., Goldberg, J., and Silberstein, S.D. (2008). Migraine in pregnancy. *BMJ* 336, 1502–1504.

Goadsby, P.J., Holland, P.R., Martins-Oliveira, M., Hoffmann, J., Schankin, C., and Akerman, S. (2017). Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. *Physiol. Rev.* 97, 553–622.

Gormley, P., Anttila, V., Winsvold, B.S., Palta, P., Esko, T., Pers, T.H., Farh, K.-H., Cuenca-Leon, E., Muona, M., Furlotte, N.A., et al. (2016). Meta-analysis of 375,000 individuals identifies 38 susceptibility loci for migraine. *Nat. Genet.* *48*, 856–866.

Gozalov, A., Jansen-Olesen, I., Klaerke, D., and Olesen, J. (2007). Role of BKCa Channels in Cephalic Vasodilation Induced by CGRP, NO and Transcranial Electrical Stimulation In The Rat. *Cephalalgia* *27*, 1120–1127.

Greco, R., Tassorelli, C., Mangione, A.S., Smeraldi, A., Allena, M., Sandrini, G., Nappi, G., and Nappi, R.E. (2013). Effect of Sex and Estrogens on Neuronal Activation in an Animal Model of Migraine. *Headache J. Head Face Pain* *53*, 288–296.

Greco, R., Demartini, C., Zanaboni, A.M., and Tassorelli, C. (2018). Chronic and intermittent administration of systemic nitroglycerin in the rat induces an increase in the gene expression of CGRP in central areas: potential contribution to pain processing. *J. Headache Pain* *19*.

Guo, W., Wang, H., Watanabe, M., Shimizu, K., Zou, S., LaGraize, S.C., Wei, F., Dubner, R., and Ren, K. (2007). Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 6006–6018.

Gupta, K., Hardingham, G.E., and Chandran, S. (2013). NMDA receptor-dependent glutamate excitotoxicity in human embryonic stem cell-derived neurons. *Neurosci. Lett.* *543*, 95–100.

Gustafson, E.C., Stevens, E.R., Wolosker, H., and Miller, R.F. (2007). Endogenous D-serine contributes to NMDA-receptor-mediated light-evoked responses in the vertebrate retina. *J. Neurophysiol.* *98*, 122–130.

Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V.L., Charles, A.C., and Kater, S.B. (1999). ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves. *J. Neurosci.* *19*, 520–528.

Gutnick, M.J., Connors, B.W., and Ransom, B.R. (1981). Dye-coupling between glial cells in the guinea pig neocortical slice. *Brain Res.* *213*, 486–492.

Guy, N., Chalus, M., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2005). Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 741–754.

Guy, N., Marques, A.R., Orliaguet, T., Lanteri-Minet, M., Dallel, R., and Clavelou, P. (2010). Are there differences between cephalic and extracephalic cutaneous allodynia in migraine patients? *Cephalalgia Int. J. Headache* *30*, 881–886.

Gwak, Y.S., Kang, J., Unabia, G.C., and Hulsebosch, C.E. (2012). Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* *234*, 362–372.

Haber, M., Zhou, L., and Murai, K.K. (2006). Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 8881–8891.

- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., and Haydon, P.G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 6473–6477.
- Hall, T.M., Nazarpour, K., and Jackson, A. (2014). Real-time estimation and biofeedback of single-neuron firing rates using local field potentials. *Nat. Commun.* *5*, 5462.
- Hamilton, N., Vayro, S., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., Robbins, J., Gorecki, D.C., and Butt, A.M. (2008). Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia* *56*, 734–749.
- Han, L., Liu, Y., Xiong, H., and Hong, P. (2019). CGRP monoclonal antibody for preventive treatment of chronic migraine: An update of meta-analysis. *Brain Behav.* *9*.
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., Xu, Q., Oberheim, N.A., Bekar, L., Betstadt, S., et al. (2013). Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell* *12*, 342–353.
- Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *48*, 457–476.
- Haque, T., Akhter, F., Kato, T., Sato, F., Takeda, R., Higashiyama, K., Moritani, M., Bae, Y.-C., Sessle, B.J., and Yoshida, A. (2012). Somatotopic direct projections from orofacial areas of secondary somatosensory cortex to trigeminal sensory nuclear complex in rats. *Neuroscience* *219*, 214–233.
- Harris, A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *94*, 120–143.
- Haydon, P.G. (2016). The Evolving View of Astrocytes. *Cerebrum Dana Forum Brain Sci.* *2016*.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* *463*, 232–236.
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* *62*, 1377–1391.
- Herreras, O. (2016). Local Field Potentials: Myths and Misunderstandings. *Front. Neural Circuits* *10*, 101.
- Hickman, S.E., Kingery, N.D., Ohsumi, T.K., Borowsky, M.L., Wang, L., Means, T.K., and El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* *16*, 1896–1905.
- Hill, R. (2000). NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol. Sci.* *21*, 244–246.
- Hirrlinger, J., Hülsmann, S., and Kirchhoff, F. (2004). Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 2235–2239.

Ho, T.W., Ferrari, M.D., Dodick, D.W., Galet, V., Kost, J., Fan, X., Leibensperger, H., Froman, S., Assaid, C., Lines, C., et al. (2008). Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *The Lancet* 372, 2115–2123.

Ho, T.W., Connor, K.M., Zhang, Y., Pearlman, E., Koppenhaver, J., Fan, X., Lines, C., Edvinsson, L., Goadsby, P.J., and Michelson, D. (2014). Randomized controlled trial of the CGRP receptor antagonist telcagepant for migraine prevention. *Neurology* 83, 958–966.

Honda, K., and Takano, Y. (2009). New Topics in Vasopressin Receptors and Approach to Novel Drugs: Involvement of Vasopressin V1a and V1b Receptors in Nociceptive Responses and Morphine-Induced Effects. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 38–43.

Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., and Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5207–5217.

Hua, X.-Y., Svensson, C.I., Matsui, T., Fitzsimmons, B., Yaksh, T.L., and Webb, M. (2005). Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2431–2440.

Iversen, H.K., Olesen, J., and Tfelt-Hansen, P. (1989). Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. *Pain* 38, 17–24.

Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., et al. (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 106, 1590–1600.

Jackson, A., and Hall, T. (2016). Decoding Local Field Potentials for Neural Interfaces. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* PP, 1–1.

Jackson, P.S., and Madsen, J.R. (1997). Identification of the volume-sensitive organic osmolyte/anion channel in human glial cells. *Pediatr. Neurosurg.* 27, 286–291.

Jasmin, L., Burkey, A.R., Card, J.P., and Basbaum, A.I. (1997). Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid, in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 3751–3765.

Jeon, Y., Park, K.B., Pervin, R., Kim, T.W., and Youn, D. (2015). Orexin-A modulates excitatory synaptic transmission and neuronal excitability in the spinal cord substantia gelatinosa. *Neurosci. Lett.* 604, 128–133.

Ji, R.-R., and Suter, M.R. (2007). p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol. Pain* 3, 33.

Ji, R.-R., Gereau, R.W., Malcangio, M., and Strichartz, G.R. (2009). MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev.* 60, 135–148.

Ji, R.-R., Berta, T., and Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl 1, S10-28.

Ji, R.-R., Donnelly, C.R., and Nedergaard, M. (2019a). Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 667–685.

Ji, Y., Rizk, A., Voulalas, P., Aljohani, H., Akerman, S., Dussor, G., Keller, A., and Masri, R. (2019b). Sex differences in the expression of calcitonin gene-related peptide receptor components in the spinal trigeminal nucleus. *Neurobiol. Pain Camb. Mass* 6, 100031.

Jiang, B.-C., Cao, D.-L., Zhang, X., Zhang, Z.-J., He, L.-N., Li, C.-H., Zhang, W.-W., Wu, X.-B., Berta, T., Ji, R.-R., et al. (2016). CXCL13 drives spinal astrocyte activation and neuropathic pain via CXCR5. *J. Clin. Invest.* 126, 745–761.

Jiang, W., Wang, Y., Sun, W., and Zhang, M. (2017). Morin Suppresses Astrocyte Activation and Regulates Cytokine Release in Bone Cancer Pain Rat Models. *Phytother. Res. PTR* 31, 1298–1304.

Jiruska, P., Cmejla, R., Powell, A.D., Chang, W.-C., Vreugdenhil, M., and Jefferys, J.G.R. (2009). Reference noise method of removing powerline noise from recorded signals. *J. Neurosci. Methods* 184, 110–114.

Jones, B.J., and Roberts, D.J. (1968). The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 302–304.

Jones, M., Lever, I., Bingham, S., Read, S., McMahon, S., and Parsons, A. (2001). Nitric Oxide Potentiates Response of Trigeminal Neurones to Dural or Facial Stimulation in the Rat. *Cephalalgia* 21, 643–655.

Kabba, J.A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., Zhang, L., Saavedra, J.M., and Pang, T. (2018). Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 53–71.

Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1, 683–692.

Karatas, H., Erdener, S.E., Gursoy-Ozdemir, Y., Lule, S., Eren-Koçak, E., Sen, Z.D., and Dalkara, T. (2013). Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science* 339, 1092–1095.

Kelly, J.W., Siewiorek, D.P., Smailagic, A., and Wang, W. (2016). An Adaptive Filter for the Removal of Drifting Sinusoidal Noise Without a Reference. *IEEE J. Biomed. Health Inform.* 20, 213–221.

Kelly, R.C., Smith, M.A., Kass, R.E., and Lee, T.S. (2010). Local field potentials indicate network state and account for neuronal response variability. *J. Comput. Neurosci.* 29, 567–579.

Kersanté, F., Rowley, S.C.S., Pavlov, I., Gutiérrez-Mecinas, M., Semyanov, A., Reul, J.M.H.M., Walker, M.C., and Linthorst, A.C.E. (2013). A functional role for both γ -aminobutyric acid

(GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J. Physiol.* *591*, 2429–2441.

Keshtkaran, M.R., and Yang, Z. (2012). Power line interference cancellation in in-vivo neural recording. In 2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, pp. 5214–5217.

Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* *31*, 653–659.

Khasabov, S.G., Malecha, P., Noack, J., Tabakov, J., Okamoto, K., Bereiter, D.A., and Simone, D.A. (2015). Activation of rostral ventromedial medulla neurons by noxious stimulation of cutaneous and deep craniofacial tissues. *J. Neurophysiol.* *113*, 14–22.

Khurgel, M., Koo, A.C., and Ivy, G.O. (1996). Selective ablation of astrocytes by intracerebral injections of alpha-aminoadipate. *Glia* *16*, 351–358.

Knight, Y.E., and Goadsby, P.J. (2001). The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine? *Neuroscience* *106*, 793–800.

Koulchitsky, S., Fischer, M.J.M., De Col, R., Schlechtweg, P.M., and Messlinger, K. (2004). Biphasic response to nitric oxide of spinal trigeminal neurons with meningeal input in rat--possible implications for the pathophysiology of headaches. *J. Neurophysiol.* *92*, 1320–1328.

Kruuse, C., Thomsen, L.L., Birk, S., and Olesen, J. (2003). Migraine can be induced by sildenafil without changes in middle cerebral artery diameter. *Brain* *126*, 241–247.

Kubo, A., Shinoda, M., Katagiri, A., Takeda, M., Suzuki, T., Asaka, J., Yeomans, D.C., and Iwata, K. (2017). Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury through vasopressin-1A receptors of the rat trigeminal ganglia. *Pain* *158*, 649–659.

Lagarias, J.C., Reeds, J.A., Wright, M.H., and Wright, P.E. (1998). Convergence Properties of the Nelder--Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM J. Optim.* *9*, 112–147.

Lai, T.-H., Fuh, J.-L., and Wang, S.-J. (2009). Cranial autonomic symptoms in migraine: characteristics and comparison with cluster headache. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *80*, 1116–1119.

Lapirot, O., Chebbi, R., Monconduit, L., Artola, A., Dallel, R., and Luccarini, P. (2009). NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat. *Pain* *142*, 245–254.

Lapirot, O., Melin, C., Modolo, A., Nicolas, C., Messaoudi, Y., Monconduit, L., Artola, A., Luccarini, P., and Dallel, R. (2011). Tonic and phasic descending dopaminergic controls of nociceptive transmission in the medullary dorsal horn. *Pain* *152*, 1821–1831.

Larsen, B.R., Stoica, A., and MacAulay, N. (2016). Managing Brain Extracellular K⁺ during Neuronal Activity: The Physiological Role of the Na⁺/K⁺-ATPase Subunit Isoforms. *Front. Physiol.* *7*.

- Le Bars, D., and Willer, J.-C. (2004). Physiologie de la douleur. EMC - Anesth.-Réanimation *1*, 227–266.
- Leao, A.A.P. (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* *7*, 359–390.
- Lee, S.-W., Kim, W.J., Choi, Y.K., Song, H.S., Son, M.J., Gelman, I.H., Kim, Y.-J., and Kim, K.-W. (2003). SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat. Med.* *9*, 900–906.
- Lefèvre, Y., Amadio, A., Vincent, P., Descheemaeker, A., Oliet, S.H.R., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2015). Neuropathic pain depends upon D-serine co-activation of spinal NMDA receptors in rats. *Neurosci. Lett.* *603*, 42–47.
- Levy, D., Jakubowski, M., and Burstein, R. (2004). Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT_{1B/1D} receptor agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4274–4279.
- Levy, D., Burstein, R., and Strassman, A.M. (2005). Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine. *Ann. Neurol.* *58*, 698–705.
- Li, G., Zeng, X., Zhou, X., Zhou, Y., Liu, G., and Zhou, X. (2012). Robust suppression of nonstationary power-line interference in electrocardiogram signals. *Physiol. Meas.* *33*, 1151–1169.
- Li, S., Uno, Y., Rudolph, U., Cobb, J., Liu, J., Anderson, T., Levy, D., Balu, D.T., and Coyle, J.T. (2018). Astrocytes in primary cultures express serine racemase, synthesize d-serine and acquire A1 reactive astrocyte features. *Biochem. Pharmacol.* *151*, 245–251.
- Li, W.-W., Guo, T.-Z., Shi, X., Sun, Y., Wei, T., Clark, D.J., and Kingery, W.S. (2015). Substance P spinal signaling induces glial activation and nociceptive sensitization after fracture. *Neuroscience* *310*, 73–90.
- Linde, M., Mulleners, W.M., Chronicle, E.P., and McCrory, D.C. (2013). Topiramate for the prophylaxis of episodic migraine in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD010610.
- Lindén, H., Tetzlaff, T., Potjans, T.C., Pettersen, K.H., Grün, S., Diesmann, M., and Einevoll, G.T. (2011). Modeling the spatial reach of the LFP. *Neuron* *72*, 859–872.
- Lipton, R.B., Hamelsky, S.W., Kolodner, K.B., Steiner, T.J., and Stewart, W.F. (2000). Migraine, quality of life, and depression: a population-based case-control study. *Neurology* *55*, 629–635.
- Lipton, R.B., Bigal, M.E., Diamond, M., Freitag, F., Reed, M.L., Stewart, W.F., and AMPP Advisory Group (2007). Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. *Neurology* *68*, 343–349.
- Lipton, R.B., Tepper, S.J., Reuter, U., Silberstein, S., Stewart, W.F., Nilsen, J., Leonardi, D.K., Desai, P., Cheng, S., Mikol, D.D., et al. (2019). Erenumab in chronic migraine: Patient-reported outcomes in a randomized double-blind study. *Neurology* *92*, e2250–e2260.

- Liu, X., and Sandkühler, J. (1997). Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J. Neurophysiol.* *78*, 1973–1982.
- Liu, X.G., and Sandkühler, J. (1995). Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci. Lett.* *191*, 43–46.
- Liu, X.G., and Sandkühler, J. (1998). Activation of spinal N-methyl-D-aspartate or neurokinin receptors induces long-term potentiation of spinal C-fibre-evoked potentials. *Neuroscience* *86*, 1209–1216.
- Liu, Q.-Y., Schaffner, A.E., Chang, Y.H., Maric, D., and Barker, J.L. (2000). Persistent Activation of GABA_A Receptor/Cl⁻ Channels by Astrocyte-Derived GABA in Cultured Embryonic Rat Hippocampal Neurons. *J. Neurophysiol.* *84*, 1392–1403.
- Liu, W.-T., Han, Y., Li, H.-C., Adams, B., Zheng, J.-H., Wu, Y.-P., Henkemeyer, M., and Song, X.-J. (2009). An in vivo mouse model of long-term potentiation at synapses between primary afferent C-fibers and spinal dorsal horn neurons: essential role of EphB1 receptor. *Mol. Pain* *5*, 29.
- Liu, X., Zhou, L., Ding, F., Wang, Y., and Yan, J. (2015). Local field potentials are local events in the mouse auditory cortex. *Eur. J. Neurosci.* *42*, 2289–2297.
- Long, T., He, W., Pan, Q., Zhang, S., Zhang, Y., Liu, C., Liu, Q., Qin, G., Chen, L., and Zhou, J. (2018). Microglia P2X₄ receptor contributes to central sensitization following recurrent nitroglycerin stimulation. *J. Neuroinflammation* *15*, 245.
- López-Corcuera, B., Benito-Muñoz, C., and Aragón, C. (2017). Glycine Transporters in Glia Cells: Structural Studies. *Adv. Neurobiol.* *16*, 13–32.
- Lorenzo, L.-E., Ramien, M., St Louis, M., De Koninck, Y., and Ribeiro-da-Silva, A. (2008). Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J. Comp. Neurol.* *508*, 592–604.
- Louter, M.A., Bosker, J.E., van Oosterhout, W.P.J., van Zwet, E.W., Zitman, F.G., Ferrari, M.D., and Terwindt, G.M. (2013). Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. *Brain J. Neurol.* *136*, 3489–3496.
- Lundgaard, I., Osório, M.J., Kress, B.T., Sanggaard, S., and Nedergaard, M. (2014). White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* *276*, 161–173.
- Magni, G., Boccuzzi, M., Bodini, A., Abbracchio, M.P., van den Maagdenberg, A.M., and Ceruti, S. (2019). Basal astrocyte and microglia activation in the central nervous system of Familial Hemiplegic Migraine Type I mice. *Cephalalgia Int. J. Headache* 333102419861710.
- Mainero, C., Boshyan, J., and Hadjikhani, N. (2011). Altered functional magnetic resonance imaging resting-state connectivity in periaqueductal gray networks in migraine. *Ann. Neurol.* *70*, 838–845.

- Malarkey, E.B., and Parpura, V. (2008). Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.* 52, 142–154.
- Malick, A., Strassman, R.M., and Burstein, R. (2000). Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *J. Neurophysiol.* 84, 2078–2112.
- Manabe, T., Yamamoto, A., Satoh, K., and Ichihara, K. (2001). Tolerance to Nitroglycerin Induced by Isosorbide-5-Mononitrate Infusion in Vivo. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1370–1372.
- Manassero, G., Repetto, I.E., Cobianchi, S., Valsecchi, V., Bonny, C., Rossi, F., and Vercelli, A. (2012). Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. *Mol. Pain* 8, 39.
- Marciszewski, K.K., Meylakh, N., Pietro, F.D., Macefield, V.G., Macey, P.M., and Henderson, L.A. (2019). Fluctuating regional brainstem diffusion imaging measures of microstructure across the migraine cycle. *ENeuro*.
- Markham, A. (2018). Erenumab: First Global Approval. *Drugs* 78, 1157–1161.
- Martineau, M., Baux, G., and Mothet, J.-P. (2006). D-serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci.* 29, 481–491.
- Martineau, M., Shi, T., Puyal, J., Knolhoff, A.M., Dulong, J., Gasnier, B., Klingauf, J., Sweedler, J.V., Jahn, R., and Mothet, J.-P. (2013). Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 3413–3423.
- Mason, B.N., Kaiser, E.A., Kuburas, A., Loomis, M.-C.M., Latham, J.A., Garcia-Martinez, L.F., and Russo, A.F. (2017). Induction of Migraine-Like Photophobic Behavior in Mice by Both Peripheral and Central CGRP Mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 204–216.
- May, A., and Goadsby, P.J. (2001). Substance P receptor antagonists in the therapy of migraine. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 673–678.
- May, A., and Schulte, L.H. (2016). Chronic migraine: risk factors, mechanisms and treatment. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 455–464.
- McBurney-Lin, J., Lu, J., Zuo, Y., and Yang, H. (2019). Locus coeruleus-norepinephrine modulation of sensory processing and perception: A focused review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 105, 190–199.
- Melin, C., Jacquot, F., Dallel, R., and Artola, A. (2013). Segmental disinhibition suppresses C-fiber inputs to the rat superficial medullary dorsal horn via the activation of GABAB receptors. *Eur. J. Neurosci.* 37, 417–428.
- Melin, C., Jacquot, F., Vitello, N., Dallel, R., and Artola, A. (2017). Different processing of meningeal and cutaneous pain information in the spinal trigeminal nucleus caudalis. *Cephalalgia Int. J. Headache* 37, 1189–1201.

Melo-Carrillo, A., and Lopez-Avila, A. (2013). A chronic animal model of migraine, induced by repeated meningeal nociception, characterized by a behavioral and pharmacological approach. *Cephalalgia* 33, 1096–1105.

Melo-Carrillo, A., Nosedá, R., Nir, R.-R., Schain, A.J., Stratton, J., Strassman, A.M., and Burstein, R. (2017). Selective Inhibition of Trigeminovascular Neurons by Fremanezumab: A Humanized Monoclonal Anti-CGRP Antibody. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 7149–7163.

Menétrey, D., Chaouch, A., Binder, D., and Besson, J.M. (1982). The origin of the spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 206, 193–207.

Messlinger, K., and Dux, M. (2017). Functional Anatomy of Trigeminovascular Pain. In *Neurobiological Basis of Migraine*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–29.

Millan, M.J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1–164.

Minen, M.T., Dhaem, O.B.D., Diest, A.K.V., Powers, S., Schwedt, T.J., Lipton, R., and Silbersweig, D. (2016). Migraine and its psychiatric comorbidities. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 741–749.

Miracourt, L.S., Peirs, C., Dallel, R., and Voisin, D.L. (2011). Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through astrocyte-derived D-serine. *Pain* 152, 1340–1348.

Mohammadi Vosough, E., Baradaran Rahimi, V., Masoud, S.A., Mirkarimi, H.R., Demneh, M.K., Abed, A., Banafshe, H.R., and Askari, V.R. (2019). Evaluation of protective effects of non-selective cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 against the nitroglycerine-induced acute and chronic animal models of migraine: A mechanistic study. *Life Sci.* 232, 116670.

Mohan, N., Kumar S, S., and Kp, S. (2018). An ℓ_1 -Norm Based Optimization Approach for Power Line Interference Removal in ECG Signals. pp. 319–329.

Moon, J.-Y., Choi, S.-R., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Kwon, S.-G., Choi, H.-S., Kang, S.-Y., Han, H.-J., Kim, H.-W., Beitz, A.J., et al. (2015). Spinal sigma-1 receptor activation increases the production of d-serine in astrocytes which contributes to the development of mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Pharmacol. Res.* 100, 353–364.

Moore, R.A., Derry, S., Wiffen, P.J., Straube, S., and Aldington, D.J. (2015). Overview review: Comparative efficacy of oral ibuprofen and paracetamol (acetaminophen) across acute and chronic pain conditions. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 19, 1213–1223.

Moreno-Ajona, D., Chan, C., Villar-Martínez, M.D., and Goadsby, P.J. (2019). Targeting CGRP and 5-HT_{1F} Receptors for the Acute Therapy of Migraine: A Literature Review. *Headache* 59 Suppl 2, 3–19.

Morioka, N., Fujii, S., Kondo, S., Zhang, F.F., Miyauchi, K., Nakamura, Y., Hisaoka-Nakashima, K., and Nakata, Y. (2018). Downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to upregulation of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 and mechanical hypersensitivity in mice. *Glia* 66, 428–444.

- Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., and Snyder, S.H. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4926–4931.
- Mothet, J.-P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., and Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5606–5611.
- Moye, L.S., Tipton, A.F., Dripps, I., Sheets, Z., Crombie, A., Violin, J.D., and Pradhan, A.A. (2019). Delta opioid receptor agonists are effective for multiple types of headache disorders. *Neuropharmacology* *148*, 77–86.
- Nadelmann, J.W., Phil, M., Stevens, J., and Saper, J.R. (1986). Propranolol in the prophylaxis of migraine. *Headache* *26*, 175–182.
- Nagelhus, E.A., Mathiesen, T.M., and Ottersen, O.P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* *129*, 905–913.
- Nam, Y., Kim, J.-H., Kim, J.-H., Jha, M.K., Jung, J.Y., Lee, M.-G., Choi, I.-S., Jang, I.-S., Lim, D.G., Hwang, S.-H., et al. (2016). Reversible Induction of Pain Hypersensitivity following Optogenetic Stimulation of Spinal Astrocytes. *Cell Rep.* *17*, 3049–3061.
- Nauhaus, I., Busse, L., Carandini, M., and Ringach, D.L. (2009). Stimulus contrast modulates functional connectivity in visual cortex. *Nat. Neurosci.* *12*, 70–76.
- Nave, K.-A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* *468*, 244–252.
- Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* *263*, 1768–1771.
- Newman, E.A. (2003). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 1659–1666.
- Ni, H., Wang, Y., An, K., Liu, Q., Xu, L., Zhu, C., Deng, H., He, Q., Wang, T., Xu, M., et al. (2019). Crosstalk between NFκB-dependent astrocytic CXCL1 and neuron CXCR2 plays a role in descending pain facilitation. *J. Neuroinflammation* *16*, 1.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* *308*, 1314–1318.
- Nosedá, R., and Villanueva, L. (2017). Functional Architecture of Central Pain Pathways: Focus on the Trigeminovascular System. In *Neurobiological Basis of Migraine*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 69–90.
- Nosedá, R., Constandil, L., Bourgeois, L., Chalus, M., and Villanueva, L. (2010). Changes of Meningeal Excitability Mediated by Corticotrigeminal Networks: A Link for the Endogenous Modulation of Migraine Pain. *J. Neurosci.* *30*, 14420–14429.

- Nosedá, R., Jakubowski, M., Kainz, V., Borsook, D., and Burstein, R. (2011). Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: implications for migraine headache and its associated symptoms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 14204–14217.
- Nosedá, R., Kainz, V., Borsook, D., and Burstein, R. (2014). Neurochemical Pathways That Converge on Thalamic Trigemino-vascular Neurons: Potential Substrate for Modulation of Migraine by Sleep, Food Intake, Stress and Anxiety. *PLoS ONE* *9*.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J. Neurosci.* *29*, 3276–3287.
- Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H.-U., Jönsson, B., CDBE2010 study group, and European Brain Council (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur. J. Neurol.* *19*, 155–162.
- Oshinsky, M.L., Sanghvi, M.M., Maxwell, C.R., Gonzalez, D., Spangenberg, R.J., Cooper, M., and Silberstein, S.D. (2012). Spontaneous trigeminal allodynia in rats: a model of primary headache. *Headache* *52*, 1336–1349.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* *125*, 775–784.
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* *146*, 785–798.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.-P., and Oliet, S.H.R. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* *150*, 633–646.
- Papouin, T., Henneberger, C., Rusakov, D.A., and Oliet, S.H.R. (2017). Astroglial versus Neuronal D-Serine: Fact Checking. *Trends Neurosci.* *40*, 517–520.
- Pardutz, A., and Schoenen, J. (2010). NSAIDs in the Acute Treatment of Migraine: A Review of Clinical and Experimental Data. *Pharmaceuticals* *3*, 1966–1987.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* *369*, 744–747.
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., and Haydon, P.G. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* *310*, 113–116.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 7817–7830.

- Pavlovic, J.M., Vieira, J.R., Lipton, R.B., and Bond, D.S. (2017). Association Between Obesity and Migraine in Women. *Curr. Pain Headache Rep.* *21*, 41.
- Perea, G., and Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* *317*, 1083–1086.
- Peres, M.F.P., Mercante, J.P.P., Tobo, P.R., Kamei, H., and Bigal, M.E. (2017). Anxiety and depression symptoms and migraine: a symptom-based approach research. *J. Headache Pain* *18*, 37.
- Perez, E.J., Tapanes, S.A., Loris, Z.B., Balu, D.T., Sick, T.J., Coyle, J.T., and Liebl, D.J. Enhanced astrocytic d-serine underlies synaptic damage after traumatic brain injury. *J. Clin. Invest.* *127*, 3114–3125.
- Perez, E.J., Tapanes, S.A., Loris, Z.B., Balu, D.T., Sick, T.J., Coyle, J.T., and Liebl, D.J. Enhanced astrocytic d-serine underlies synaptic damage after traumatic brain injury. *J. Clin. Invest.* *127*, 3114–3125.
- Perry, V.H. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* *90*, 113–121.
- Pietrobon, D. (2007). Familial hemiplegic migraine. *4*, 11.
- Pietrobon, D., and Brennan, K.C. (2019). Genetic mouse models of migraine. *J. Headache Pain* *20*, 79.
- Polderman, T.J.C., Benyamin, B., de Leeuw, C.A., Sullivan, P.F., van Bochoven, A., Visscher, P.M., and Posthuma, D. (2015). Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. *Nat. Genet.* *47*, 702–709.
- Pradhan, A.A., Smith, M.L., McGuire, B., Tarash, I., Evans, C.J., and Charles, A. (2014a). Characterization of a novel model of chronic migraine. *Pain* *155*, 269–274.
- Pradhan, A.A., Smith, M.L., Zyuzin, J., and Charles, A. (2014b). δ -Opioid receptor agonists inhibit migraine-related hyperalgesia, aversive state and cortical spreading depression in mice. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 2375–2384.
- Raghavendra, V., Tanga, F.Y., and DeLeo, J.A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 467–473.
- Rahmann, A., Wienecke, T., Hansen, J., Fahrenkrug, J., Olesen, J., and Ashina, M. (2008). Vasoactive Intestinal Peptide Causes Marked Cephalic Vasodilation, but does not Induce Migraine. *Cephalalgia* *28*, 226–236.
- Ramírez, J.M., Triviño, A., Ramírez, A.I., Salazar, J.J., and García-Sánchez, J. (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res.* *36*, 2029–2036.
- Rao, V.L.R., Dogan, A., Todd, K.G., Bowen, K.K., Kim, B.-T., Rothstein, J.D., and Dempsey, R.J. (2001). Antisense Knockdown of the Glial Glutamate Transporter GLT-1, But Not the Neuronal

Glutamate Transporter EAAC1, Exacerbates Transient Focal Cerebral Ischemia-Induced Neuronal Damage in Rat Brain. *J. Neurosci.* *21*, 1876–1883.

Rasch, M., Logothetis, N., and Kreiman, G. (2009). From neurons to circuits: linear estimation of local field potentials. *J. Neurosci.* *29*, 13785.

Rasch, M.J., Gretton, A., Murayama, Y., Maass, W., and Logothetis, N.K. (2008). Inferring spike trains from local field potentials. *J. Neurophysiol.* *99*, 1461–1476.

Ray, S. (2015). Challenges in the quantification and interpretation of spike-LFP relationships. *Curr. Opin. Neurobiol.* *31*, 111–118.

Ray, S., and Maunsell, J.H.R. (2011). Network rhythms influence the relationship between spike-triggered local field potential and functional connectivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 12674–12682.

Recober, A., and Goadsby, P.J. (2010). Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a molecular link between obesity and migraine? *Drug News Perspect.* *23*, 112–117.

Renthal, W. (2018). Localization of migraine susceptibility genes in human brain by single-cell RNA sequencing. *Cephalalgia* 0333102418762476.

Retamal, M.A., Riquelme, M.A., Stehberg, J., and Alcayaga, J. (2017). Connexin43 Hemichannels in Satellite Glial Cells, Can They Influence Sensory Neuron Activity? *Front. Mol. Neurosci.* *10*.

Reuter, U., Weber, J.R., Gold, L., Arnold, G., Wolf, T., Dreier, J., Lindauer, U., and Dirnagl, U. (1998). Perivascular nerves contribute to cortical spreading depression-associated hyperemia in rats. *Am. J. Physiol.* *274*, H1979-1987.

Reuter, U., Bolay, H., Jansen-Olesen, I., Chiarugi, A., del Rio, M.S., Letourneau, R., Theoharides, T.C., Waeber, C., and Moskowitz, M.A. (2001). Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. *Brain* *124*, 2490–2502.

Reuter, U., Chiarugi, A., Bolay, H., and Moskowitz, M.A. (2002). Nuclear factor- κ B as a molecular target for migraine therapy. *Ann. Neurol.* *51*, 507–516.

Roch, M., Messlinger, K., Kulchitsky, V., Tichonovich, O., Azev, O., and Koulchitsky, S. (2007). Ongoing activity in trigeminal wide-dynamic range neurons is driven from the periphery. *Neuroscience* *150*, 681–691.

Ropert, N., Jalil, A., and Li, D. (2016). Expression and cellular function of vSNARE proteins in brain astrocytes. *Neuroscience* *323*, 76–83.

Rose, C.F., Verkhratsky, A., and Parpura, V. (2013). Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 1518–1524.

Rosen, J.A. (1983). Observations on the efficacy of propranolol for the prophylaxis of migraine. *Ann. Neurol.* *13*, 92–93.

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., et al. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.

Rovegno, M., and Sáez, J.C. (2018). Role of astrocyte connexin hemichannels in cortical spreading depression. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1860, 216–223.

Russell, M. (1997). Genetic Epidemiology of Migraine and Cluster Headache. *Cephalalgia* 17, 683–701.

Samineni, V.K., Grajales-Reyes, J.G., Copits, B.A., O'Brien, D.E., Trigg, S.L., Gomez, A.M., Bruchas, M.R., and Gereau, R.W. (2017). Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray. *ENeuro* 4.

Sandkühler, J., and Liu, X. (1998). Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2476–2480.

Sandrini, G., Rossi, P., Milanov, I., Serrao, M., Cecchini, A., and Nappi, G. (2006). Abnormal Modulatory Influence of Diffuse Noxious Inhibitory Controls in Migraine and Chronic Tension-Type Headache Patients. *Cephalalgia* 26, 782–789.

Savitzky, Abraham., and Golay, M.J.E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639.

Scemes, E., and Spray, D.C. (2012). Extracellular K⁺ and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochem. Res.* 37, 2310–2316.

Scher, A.I., Stewart, W.F., Ricci, J.A., and Lipton, R.B. (2003). Factors associated with the onset and remission of chronic daily headache in a population-based study. *Pain* 106, 81–89.

Schoonman, G.G., Evers, D.J., Terwindt, G.M., van Dijk, J.G., and Ferrari, M.D. (2006). The prevalence of premonitory symptoms in migraine: a questionnaire study in 461 patients. *Cephalalgia Int. J. Headache* 26, 1209–1213.

Schoonman, G.G., van der Grond, J., Kortmann, C., van der Geest, R.J., Terwindt, G.M., and Ferrari, M.D. (2008). Migraine headache is not associated with cerebral or meningeal vasodilatation—a 3T magnetic resonance angiography study. *Brain* 131, 2192–2200.

Schouenborg, J. (1984). Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous C-fibre stimulation. *J. Physiol.* 356, 169–192.

Schramm, S.H., Obermann, M., Katsarava, Z., Diener, H.-C., Moebus, S., and Yoon, M.-S. (2013). Epidemiological profiles of patients with chronic migraine and chronic tension-type headache. *J. Headache Pain* 14, 40.

Schutte, S.S., Schutte, R.J., Barragan, E.V., and O'Dowd, D.K. (2016). Model systems for studying cellular mechanisms of SCN1A-related epilepsy. *J. Neurophysiol.* 115, 1755–1766.

Schwarz, Y., Zhao, N., Kirchhoff, F., and Bruns, D. (2017). Astrocytes control synaptic strength by two distinct v-SNARE-dependent release pathways. *Nat. Neurosci.* *20*, 1529–1539.

Seifert, G., Henneberger, C., and Steinhäuser, C. (2018). Diversity of astrocyte potassium channels: An update. *Brain Res. Bull.* *136*, 26–36.

Shi, Y., Gelman, B.B., Lisinicchia, J.G., and Tang, S.-J. (2012). Chronic-pain-associated astrocytic reaction in the spinal cord dorsal horn of human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 10833–10840.

Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K.Y., Corey, D.P., and Khakh, B.S. (2011). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* *15*, 70–80.

Shimizu, T. (2009). [Beta blockers in migraine prophylaxis]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyu No Shinpo* *61*, 1125–1130.

Sierra, A., Castro, F. de, Río-Hortega, J. del, Iglesias-Rozas, J.R., Garrosa, M., and Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* *64*, 1801–1840.

Silberstein, S. (2015). Preventive Migraine Treatment. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* *21*, 973–989.

Simpson, K.L., Altman, D.W., Wang, L., Kirifides, M.L., Lin, R.C., and Waterhouse, B.D. (1997). Lateralization and functional organization of the locus coeruleus projection to the trigeminal somatosensory pathway in rat. *J. Comp. Neurol.* *385*, 135–147.

Smith, E.St.J., and Lewin, G.R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *J. Comp. Physiol. A* *195*, 1089–1106.

Smolders, S.M.-T., Kessels, S., Vanganswinkel, T., Rigo, J.-M., Legendre, P., and Brône, B. (2019). Microglia: Brain cells on the move. *Prog. Neurobiol.* *178*, 101612.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* *32*, 638–647.

Sofroniew, M.V. (2014). Multiple Roles for Astrocytes as Effectors of Cytokines and Inflammatory Mediators. *The Neuroscientist* *20*, 160–172.

Söhl, G., Odermatt, B., Maxeiner, S., Degen, J., and Willecke, K. (2004). New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants. *Brain Res. Rev.* *47*, 245–259.

Solstrand Dahlberg, L., Linnman, C.N., Lee, D., Burstein, R., Becerra, L., and Borsook, D. (2018). Responsivity of Periaqueductal Gray Connectivity Is Related to Headache Frequency in Episodic Migraine. *Front. Neurol.* *9*, 61.

Song, Z.-P., Xiong, B.-R., Guan, X.-H., Cao, F., Manyande, A., Zhou, Y.-Q., Zheng, H., and Tian, Y.-K. (2016). Minocycline attenuates bone cancer pain in rats by inhibiting NF- κ B in spinal astrocytes. *Acta Pharmacol. Sin.* *37*, 753–762.

Sotocinal, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., Tuttle, A.H., Martin, L.J., Wieskopf, J.S., Mapplebeck, J.C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., et al. (2011). The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol. Pain* *7*, 55.

Srinivasan, R., Huang, B.S., Venugopal, S., Johnston, A.D., Chai, H., Zeng, H., Golshani, P., and Khakh, B.S. (2015). Ca²⁺ signaling in astrocytes from *Ip3r2*^{-/-} mice in brain slices and during startle responses *in vivo*. *Nat. Neurosci.* *18*, 708–717.

Steiner, T.J., Stovner, L.J., Vos, T., Jensen, R., and Katsarava, Z. (2018). Migraine is first cause of disability in under 50s: will health politicians now take notice? *J. Headache Pain* *19*.

Stewart, W.F., Linet, M.S., Celentano, D.D., Van Natta, M., and Ziegler, D. (1991). Age- and sex-specific incidence rates of migraine with and without visual aura. *Am. J. Epidemiol.* *134*, 1111–1120.

Stewart, W.F., Lipton, R.B., Chee, E., Sawyer, J., and Silberstein, S.D. (2000). Menstrual cycle and headache in a population sample of migraineurs. *Neurology* *55*, 1517–1523.

Storchi, R., Zippo, A.G., Caramenti, G.C., Valente, M., and Biella, G.E.M. (2012). Predicting spike occurrence and neuronal responsiveness from LFPs in primary somatosensory cortex. *PLoS One* *7*, e35850.

Strassman, A.M., and Levy, D. (2006). Response properties of dural nociceptors in relation to headache. *J. Neurophysiol.* *95*, 1298–1306.

Strassman, A., Mason, P., Moskowitz, M., and Maciewicz, R. (1986). Response of brainstem trigeminal neurons to electrical stimulation of the dura. *Brain Res.* *379*, 242–250.

Strassman, A.M., Raymond, S.A., and Burstein, R. (1996). Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* *384*, 560–564.

Strömberg, I., Björklund, H., Dahl, D., Jonsson, G., Sundström, E., and Olson, L. (1986). Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. *Brain Res. Bull.* *17*, 225–236.

Sun, S., Cao, H., Han, M., Li, T.-T., Pan, H.-L., Zhao, Z.-Q., and Zhang, Y.-Q. (2007). New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Pain* *129*, 64–75.

Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M.J., Aalling, N., Wang, S., Benraiss, A., Lou, N., Goldman, S.A., et al. (2017a). SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *37*, 4493–4507.

Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M.J., Aalling, N., Wang, S., Benraiss, A., Lou, N., Goldman, S.A., et al. (2017b). SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J. Neurosci.* *37*, 4493–4507.

Suzuki, N., and Hardebo, J.E. (1993). The cerebrovascular parasympathetic innervation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* *5*, 33–46.

Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front. Neurosci.* *9*, 114.

Tan, Z., Liu, Y., Xi, W., Lou, H., Zhu, L., Guo, Z., Mei, L., and Duan, S. (2017). Glia-derived ATP inversely regulates excitability of pyramidal and CCK-positive neurons. *Nat. Commun.* *8*.

Tanabe, M., Murakami, H., Honda, M., and Ono, H. (2006). Gabapentin depresses C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn only after induction of long-term potentiation. *Exp. Neurol.* *202*, 280–286.

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* *276*, 1699–1702.

Taneri, Z., and Petersen-Braun, M. (1995). [Double blind study of intravenous aspirin vs placebo in the treatment of acute migraine attacks.]. *Schmerz Berl. Ger.* *9*, 124–129.

Tassorelli, C., and Joseph, S.A. (1995). Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res.* *682*, 167–181.

Tassorelli, C., Greco, R., Cappelletti, D., Sandrini, G., and Nappi, G. (2005). Comparative analysis of the neuronal activation and cardiovascular effects of nitroglycerin, sodium nitroprusside and l-arginine. *Brain Res.* *1051*, 17–24.

Tassorelli, C., Greco, R., Morocutti, A., Costa, A., and Nappi, G. Nitric oxide-induced neuronal activation in the central nervous system as an animal model of migraine: mechanisms and mediators. *8*.

Taves, S., Berta, T., Liu, D.-L., Gan, S., Chen, G., Kim, Y.H., Van de Ven, T., Laufer, S., and Ji, R.-R. (2016). Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain. Behav. Immun.* *55*, 70–81.

Tenza-Ferrer, H., Magno, L.A.V., Romano-Silva, M.A., da Silva, J.F., and Gomez, M.V. (2019). Ph α 1 β Spider Toxin Reverses Glial Structural Plasticity Upon Peripheral Inflammation. *Front. Cell. Neurosci.* *13*, 306.

Tepper, D. (2017). Medication Overuse Headache. *Headache J. Head Face Pain* *57*, 845–846.

Tepper, S.J., Diener, H.-C., Ashina, M., Brandes, J.L., Friedman, D.I., Reuter, U., Cheng, S., Nilsen, J., Leonardi, D.K., Lenz, R.A., et al. (2019). Erenumab in chronic migraine with medication overuse: Subgroup analysis of a randomized trial. *Neurology* *92*, e2309–e2320.

- Thalakoti, S., Patil, V.V., Damodaram, S., Vause, C.V., Langford, L.E., Freeman, S.E., and Durham, P.L. (2007). Neuron–Glia Signaling in Trigeminal Ganglion: Implications for Migraine Pathology. *Headache* 47, 1008–1025.
- Tölle, T.R., Kaufmann, T., Siessmeier, T., Lautenbacher, S., Berthele, A., Munz, F., Zieglgänsberger, W., Willoch, F., Schwaiger, M., Conrad, B., et al. (1999). Region-specific encoding of sensory and affective components of pain in the human brain: A positron emission tomography correlation analysis. *Ann. Neurol.* 45, 40–47.
- Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 877–885.
- Tsuda, M. (2016). Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *J. Diabetes Investig.* 7, 17–26.
- Tsuda, M., and Inoue, K. (2016). Neuron-microglia interaction by purinergic signaling in neuropathic pain following neurodegeneration. *Neuropharmacology* 104, 76–81.
- Tsuda, M., Kohro, Y., Yano, T., Tsujikawa, T., Kitano, J., Tozaki-Saitoh, H., Koyanagi, S., Ohdo, S., Ji, R.-R., Salter, M.W., et al. (2011). JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* 134, 1127–1139.
- Uddman, R., Tajti, J., Hou, M., Sundler, F., and Edvinsson, L. (2002). Neuropeptide expression in the human trigeminal nucleus caudalis and in the cervical spinal cord C1 and C2. *Cephalalgia Int. J. Headache* 22, 112–116.
- Verkhatsky, A., and Nedergaard, M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130595.
- Verkman, A.S. (2011). Aquaporins at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 2107–2112.
- Vinck, M., Battaglia, F.P., Womelsdorf, T., and Pennartz, C. (2012). Improved measures of phase-coupling between spikes and the Local Field Potential. *J. Comput. Neurosci.* 33, 53–75.
- Vollesen, A.L.H., Amin, F.M., and Ashina, M. (2018). Targeted Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide Therapies for Migraine. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 15, 371–376.
- Waite, P.M.E., and Ashwell, K.W.S. (2012). Trigeminal Sensory System. In *The Human Nervous System*, (Elsevier), pp. 1110–1143.
- Wall, P.D., and Lidieth, M. (1997). Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. *J. Neurophysiol.* 78, 860–871.
- Walz, W., and Lang, M.K. (1998). Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 257, 127–130.
- Wang, W., Wang, W., Mei, X., Huang, J., Wei, Y., Wang, Y., Wu, S., and Li, Y. (2009). Crosstalk between spinal astrocytes and neurons in nerve injury-induced neuropathic pain. *PLoS One* 4, e6973.

- Waterhouse, B.D., and Navarra, R.L. (2019). The locus coeruleus-norepinephrine system and sensory signal processing: A historical review and current perspectives. *Brain Res.* *1709*, 1–15.
- Welch, K.M., Nagesh, V., Aurora, S.K., and Gelman, N. (2001). Periaqueductal gray matter dysfunction in migraine: cause or the burden of illness? *Headache* *41*, 629–637.
- Wesson, K.D., Ochshorn, R.M., and Land, B.R. (2009). Low-cost, high-fidelity, adaptive cancellation of periodic 60Hz noise. *J. Neurosci. Methods* *185*, 50–55.
- Wilhelmsson, U., Li, L., Pekna, M., Berthold, C.-H., Blom, S., Eliasson, C., Renner, O., Bushong, E., Ellisman, M., Morgan, T.E., et al. (2004). Absence of Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Prevents Hypertrophy of Astrocytic Processes and Improves Post-Traumatic Regeneration. *J. Neurosci.* *24*, 5016–5021.
- Willer, J.C., Bouhassira, D., and Le Bars, D. (1999). Bases neurophysiologiques du phénomène de contre-irritation: les contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulations nociceptives. *Neurophysiol. Clin. Neurophysiol.* *29*, 379–400.
- Willmott, N.J., Wong, K., and Strong, A.J. (2000). A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca(2+) waves in glia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 1767–1779.
- Wolff, H.G. (1948). Headache and other head pain. 1948 *New York Oxford University Press*.
- Wolosker, H., Balu, D.T., and Coyle, J.T. (2016). The Rise and Fall of the d-Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis. *Trends Neurosci.* *39*, 712–721.
- Wolosker, H., Balu, D.T., and Coyle, J.T. (2017). Astroglial Versus Neuronal D-Serine: Check Your Controls! *Trends Neurosci.* *40*, 520–522.
- Wykes, P. (1968). The treatment of angina pectoris with coexistent migraine. *The Practitioner* *200*, 702–704.
- Xin, W., and Bonci, A. (2018). Functional Astrocyte Heterogeneity and Implications for Their Role in Shaping Neurotransmission. *Front. Cell. Neurosci.* *12*.
- Xu, L., He, D., and Bai, Y. (2016). Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease. *Mol. Neurobiol.* *53*, 6709–6715.
- Xu, X., Liu, Y., Dong, M., Zou, D., and Wei, Y. (2017). Tricyclic antidepressants for preventing migraine in adults. *Medicine (Baltimore)* *96*.
- Yamada, K., and Watanabe, M. (2002). Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat. Sci. Int.* *77*, 94–108.
- Yamamoto, T., Nozaki-Taguchi, N., and Chiba, T. (2002). Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br. J. Pharmacol.* *137*, 170–176.

- Yang, Z., and Wang, K.K.W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* *38*, 364–374.
- Yang, H.-W., Zhou, L.-J., Hu, N.-W., Xin, W.-J., and Liu, X.-G. (2005). Activation of spinal d1/d5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J. Neurophysiol.* *94*, 961–967.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15194–15199.
- Yarnitsky, D., Goor-Aryeh, I., Bajwa, Z.H., Ransil, B.I., Cutrer, F.M., Sottile, A., and Burstein, R. (2003). 2003 Wolff Award: Possible parasympathetic contributions to peripheral and central sensitization during migraine. *Headache* *43*, 704–714.
- York, E.M., Bernier, L.-P., and MacVicar, B.A. (2018). Microglial modulation of neuronal activity in the healthy brain. *Dev. Neurobiol.* *78*, 593–603.
- Zagami, A.S., Edvinsson, L., and Goadsby, P.J. (2014). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and migraine. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *1*, 1036–1040.
- Zanos, T.P., Mineault, P.J., and Pack, C.C. (2011). Removal of spurious correlations between spikes and local field potentials. *J. Neurophysiol.* *105*, 474–486.
- Zhang, G.-H., Lv, M.-M., Wang, S., Chen, L., Qian, N.-S., Tang, Y., Zhang, X.-D., Ren, P.-C., Gao, C.-J., Sun, X.-D., et al. (2011a). Spinal Astrocytic Activation Is Involved in a Virally-Induced Rat Model of Neuropathic Pain. *PLoS ONE* *6*.
- Zhang, G.-H., Lv, M.-M., Wang, S., Chen, L., Qian, N.-S., Tang, Y., Zhang, X.-D., Ren, P.-C., Gao, C.-J., Sun, X.-D., et al. (2011b). Spinal Astrocytic Activation Is Involved in a Virally-Induced Rat Model of Neuropathic Pain. *PLoS ONE* *6*.
- Zhang, M., Liu, Y., Zhao, M., Tang, W., Wang, X., Dong, Z., and Yu, S. (2017). Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. *J. Headache Pain* *18*, 27.
- Zhang, X., Levy, D., Nosedá, R., Kainz, V., Jakubowski, M., and Burstein, R. (2010). Activation of Meningeal Nociceptors by Cortical Spreading Depression: Implications for Migraine with Aura. *J. Neurosci.* *30*, 8807–8814.
- Zhang, X., Levy, D., Kainz, V., Nosedá, R., Jakubowski, M., and Burstein, R. (2011c). Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann. Neurol.* *69*, 855–865.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O’Keeffe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 11929–11947.

Zhang, Z.-J., Dong, Y.-L., Lu, Y., Cao, S., Zhao, Z.-Q., and Gao, Y.-J. (2012). Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the medullary dorsal horn are involved in trigeminal neuropathic pain. *J. Neuroinflammation* *9*, 136.

Zheng, W., Ouyang, H., Zheng, X., Liu, S., Mata, M., Fink, D.J., and Hao, S. (2011). Glial TNF α in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats. *Mol. Pain* *7*, 40.

Zhou, L.-J., Zhong, Y., Ren, W.-J., Li, Y.-Y., Zhang, T., and Liu, X.-G. (2008). BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Exp. Neurol.* *212*, 507–514.

Zhuang, Z.-Y., Gerner, P., Woolf, C.J., and Ji, R.-R. (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* *114*, 149–159.

Zhuang, Z.-Y., Wen, Y.-R., Zhang, D.-R., Borsello, T., Bonny, C., Strichartz, G.R., Decosterd, I., and Ji, R.-R. (2006). A Peptide c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Inhibitor Blocks Mechanical Allodynia after Spinal Nerve Ligation: Respective Roles of JNK Activation in Primary Sensory Neurons and Spinal Astrocytes for Neuropathic Pain Development and Maintenance. *J. Neurosci.* *26*, 3551–3560.

Zimmermann, H., and Braun, N. (1996). Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J. Auton. Pharmacol.* *16*, 397–400.

Zippo, A.G., Nencini, S., Caramenti, G.C., Valente, M., Storchi, R., and Biella, G.E.M. (2014). A simple stimulatory device for evoking point-like tactile stimuli: a searchlight for LFP to spike transitions. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Zwart, J.-A., Dyb, G., Hagen, K., Ødegård, K.J., Dahl, A.A., Bovim, G., and Stovner, L.J. (2003). Depression and anxiety disorders associated with headache frequency. The Nord-Trøndelag Health Study. *Eur. J. Neurol.* *10*, 147–152.

(2018). Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia* *38*, 1–211.

Annexe

En parallèle de mon projet de thèse sur la migraine chronique et le rôle des astrocytes, j'ai collaboré avec François GABRIELLI (ingénieur de recherche) sur un article que nous espérons soumettre avant fin 2019.

Au cours de cette collaboration, j'ai enregistré à la fois les champs de potentiels locaux (LFP), qui sont le reflet de l'activation locale des neurones autour de l'électrode, et l'activité unitaire. L'objectif était de comprendre comment ces deux reflets de l'activité cellulaire sont liés en utilisant une approche innovante par modélisation mathématique.

Extraction and modeling of C-fiber-evoked local field potential in deep dorsal horn from heavily corrupted signal

Gabrielli F., Megemont M., Dallel R., Luccarini P., Monconduit L.

Inserm/UdA U1107, Neuro-Dol: Trigeminal Pain and Migraine, Université d'Auvergne, Faculté de Chirurgie Dentaire, Clermont-Ferrand, France

Résumé

Les travaux ici présentés décrivent l'étude de la relation entre l'émission de potentiels d'action et le potentiel de champ local (LFP). Si la littérature est riche en méthodes basées sur le Spike Triggered Average (STA), nous cherchons à démontrer que le LFP peut être généré à partir du train de potentiels d'action déclenché par une stimulation. Le LFP et l'activité unicellulaire ont été enregistrés dans le sous noyau caudal du complexe sensitif du trijumeau (Sp5C) alors que des stimulations électriques cutanées étaient appliquées pour recruter les fibres A_β , A_δ , et C. Nous présentons ici une méthode pour éliminer le bruit important dû aux alimentations électriques ainsi que pour supprimer les potentiels d'action du LFP, duquel a été modélisée puis retirée la dépression due aux fibres A, pour récupérer la dépression due uniquement aux fibres C. Les résultats montrent qu'il est possible de générer une dépression de type C à partir du train de potentiels d'action en utilisant la convolution avec un modèle à simple exponentiel décroissant. De plus, il est possible de récupérer le PSTH des potentiels d'action à partir de la dépression C en utilisant le même modèle. Si on considère que le LFP découle d'une intégration spatiale de l'influx nerveux en réponse à une stimulation unique et provenant des neurones avoisinants, et que le PSTH est une intégration temporelle de l'activité unicellulaire sur plusieurs stimulations, on peut établir que le réseau neuronal du Sp5C se comporte comme un système ergodique, et qu'une telle caractéristique pourrait devenir la signature de son organisation somatotopique, applicable à d'autres zones neuronales.

Abstract

The present paper introduces an investigation of spikes-LFP relationship. Aside from all attempts based on STA (Spike Triggered Average) with spontaneous recordings, we hypothesized that LFP could be inferred from spikes under evoked condition. LFP and single cell spikes were recorded in the Sp5C while A_β , A_δ , and C fibers were recruited with electrical stimulation on skin. We detail a process to remove heavy powerline noise and spikes from LFP, from which the A-volley LFP depression was removed to highlight the C-volley LFP depression. Results showed that we could infer such C-volley depression from spikes using convolution and a single exponentially decaying template with acceptable correlation coefficients. In addition, we could recover the spikes as PSTH from the LFP, using the same template, again with acceptable correlation coefficient. Considering that LFP is a spatial integration of neuronal activity from nearby neurons responding to a single stimulation and PSTH is a temporal integration of a single neuron to several stimulations, neurons of Sp5C act as a ergodic system, and this characteristic could be a signature of the somatotopic organization of the Sp5C that could be used for other neuronal areas.

Introduction

There is a growing need to highlight the relationship between spiking activity and local field potential (LFP)¹⁻⁴. Several studies investigated that relationship, but only a few came close to acceptable solution, with good correlation coefficients^{3,5,6}. The latest results focused mainly on connecting the spiking activity of a single neuron, considered as a genuine marker of neuronal activity, to LFP, which is considered far easier to measure, and has multiple applications for Brain Computer Interface (BCI)^{3,4}. A commonly used approach consists in averaging the LFP around spike time, to get the Spike Time Average (STA)^{1,7-10}, and use it as a template, but whereas promising, correlation coefficient between measured LFP and calculated LFP remained low. One reason may be that under spontaneous activity, neurons respond to numerous inputs, and as LFP is considered a local, grouped activity^{11,12}, its spontaneous fluctuations are by definition subject to activity of nearby neurons, that might be different from the one that is being recorded. Considering the investigation of Spikes-LFP relationship, we made the hypothesis that a bilateral relationship exists, but, as previously stated⁹, it could only be highlighted when a group of neurons fire synchronously, and therefore it should be investigated under evoked condition only^{13,14}. The use of stimulation to generate evoked signals is already widely described in the literature, especially in the field of neuropathic pain¹⁵⁻²⁴. More specifically, whereas pain evoked LFP recording is also well documented in the sciatic nerve, our previous studies highlighted interesting results on pain evoked LFP recording in the Sp5C from cutaneous and meningeal electrical stimulations^{25,26}. In addition, the study of that area is a key factor to understand the underlying mechanisms of chronic orofacial pain and migraine, and is of great interest. Therefore, we decided to start working on electrophysiological response of WDR (Wide Dynamic Range) neurons of the dorsal horn inside the Sp5C to electrical stimulation of the face, and with a single electrode, instead of electrode array^{7-9,27,28}. Electrical face stimulation usually induce an early spiking volley corresponding to the answer from A β and A δ fibers recruitment, identified as A-volley, and a late spiking volley corresponding to the answer of slower C fiber, identified as C-volley. We focused on the pain related activity, and therefore we considered only the C-volley spikes, and the corresponding depression in the LFP, hereafter identified as C-volley LFP depression. That depression was investigated in the case of electrical stimulation of the sciatic nerve with multiple methods, such as area under curve^{21-24,26,29}, or amplitude difference with baseline^{17,30-33}. We hypothesized that the analysis of LFP and C-volley spikes during pain evoked stimulation would achieve 2 main goals.

The first goal of the present paper was to validate a new method to extract the C-volley depression of the LFP in order to be compared to a single cell spiking activity. We identified two issues that had to be solved before having access to the C-volley LFP depression: firstly, powerline noise was incredibly high and all common filtering process were obsolete/not efficient to eliminate that noise without distorting the LFP because of 1) signals must be processed off line making real-time/online approach inoperant³⁴⁻³⁷, 2) frequency bandwidth that is shared between LFP (10-150Hz) and noise and harmonics (50-100-150)³⁸, and 3) electrical stimulation artifact comes with very large discontinuities that generates ripples from usual filtering process. In addition, because analyses were done offline, no noise reference was available, thus cancelling the use of traditional adaptive noise cancellation algorithm^{39,40}. Therefore we developed our own reference free adaptive noise cancellation process using non-linear least square approach that is inspired from similar previously published process⁴¹⁻⁴³. Secondly, spatial proximity of stimulation site and recording site implied short latency on A-volley and C-volley, and very little difference between the latencies of those two spike volleys. As a consequence, C-volley LFP depression occurred within the decaying part of the A-volley LFP depression, such as already documented^{25,26}. In addition, the C-volley LFP depression might be small enough not to be visible, making traditional techniques (AUC, tangential line, etc.) ineffective. Therefore, we had to come with a way to extract the C-volley LFP from the A-volley LFP depression, using a simple mathematical model to subtract the A-volley from the LFP.

The second goal of the present paper was to investigate the relationship between C-volley LFP depression and spiking pattern. In total disagreement with the literature², we hypothesized that, even from a single electrode recording, the C-volley LFP depression could be inferred from the spike pattern, and to do so, we considered the spiking pattern obtained from several simulations instead of only one. Finally we compared

the PSTH obtained from several stimulations with the mean C-volley LFP depression, under the hypothesis that the averaging process would smooth the influence of surrounding neurons in the LFP, in order to identify how spikes infer the LFP.

Results

1 : extraction of C-volley evoked LFP

1.a : powerline noise cancellation

Due to heavy powerline noise, raw signals could not allow to study local field potential (figure 1, A). Once processed with the proposer noise removal algorithm, each evoked response exhibited a signal with little high frequency noise, numerous action potentials, and a typical A-volley and C-volley depressions (figure 1.B).

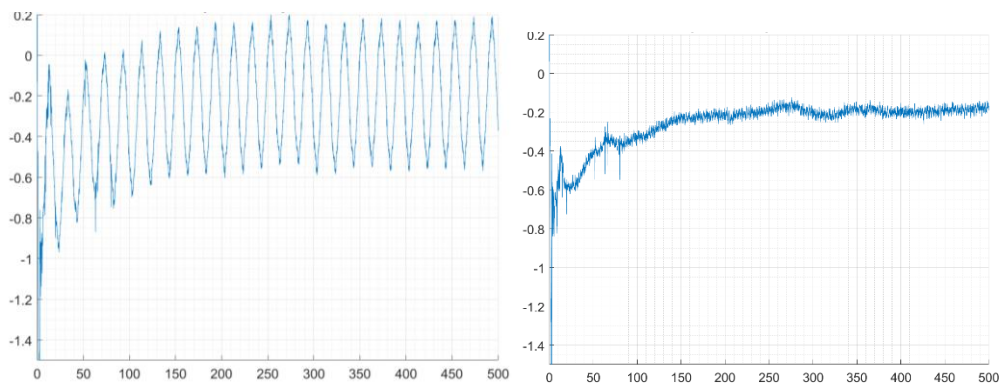


Figure 1 : (left) Raw original recording of evoked answer of a Sp5C neuron, with heavy powerline noise. (right) Same recording, but free from powerline noise. Voltage in mV against time in ms.

1.b : Production of LFP-ready signal

Once the evoked signals were noise free, they were ready to be processed to enable a proper analysis of the Local Field Potential. Spikes, as locally timed high frequency content, were successfully removed with the median filter (figure 2.A, see methods). Yet, each recording exhibited both LFP compound from the evoked stimulus and compound from all other sources. Evoked components of the LFP were highlighted after averaging, and the final signal was ready for C-volley LFP analysis (figure 2.B).

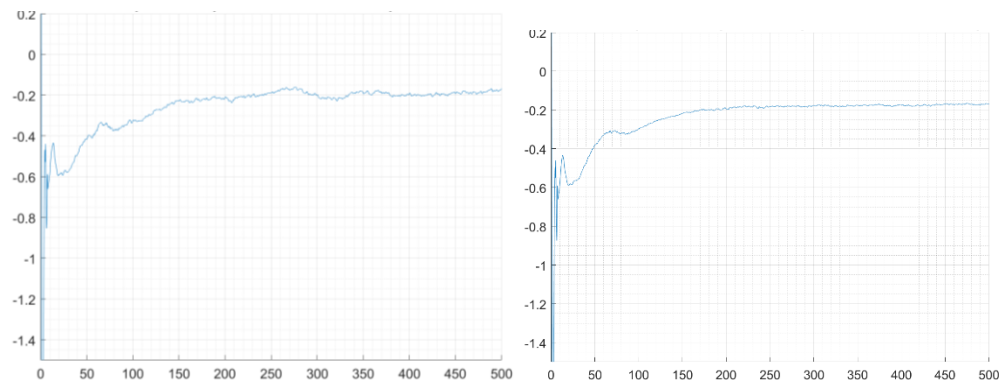


Figure 2 : (left) Noise free and spike free evoked answer. (right) Same recording, but averaged over 30 stimulations. Voltage in mV against time in ms.

1.c Extraction of C-volley LFP

Thanks to anatomical proximity of stimulation site and recording site, latencies of LFP depressions corresponding to A and C-volley were close enough to fuse. Rather than using previously published method to estimate the depth of LFP repression, we propose to separate the two depressions using an exponentially decaying model: figure 3.A shows the goodness of fit of such a model to the actual LFP.

The A-volley depression (figure 3.A in red) is subtracted from the LFP, and the C-volley depression appears clearly (figure 3.B).

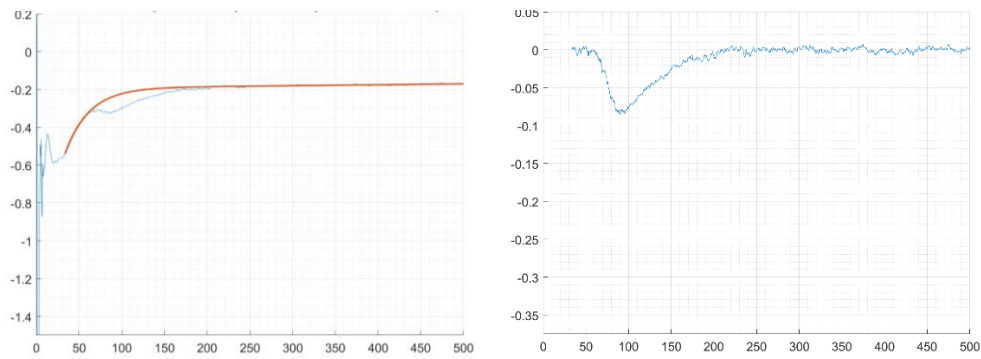


Figure 3 : (left) Goodness-of-fit of the exponential decaying model (red curve) to the A-volley depression. (right) Resulting curve once model was subtracted from the actual signal, only for time ranging from 35ms to 500ms. Voltage in mV against time in ms.

As shown on figure 3.A and 3.B, the C-volley LFP depression was a lot smaller than the A-volley depression. Overall, the present method allowed us to extract very small C-volley depressions, as expressed in % of A-volley amplitude (figure 4).

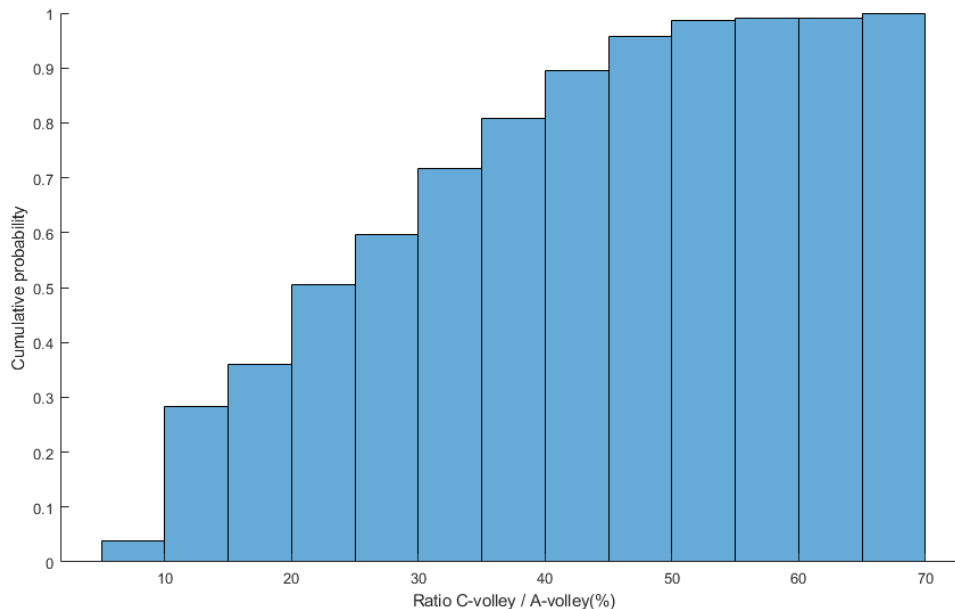


Figure 4 : cumulative histogram of relative amplitude of C-depression extracted over all recorded signals. Expressed as % of amplitude of the A-volley decaying model

Figure 4 shows that half of processed signal exhibited a C-volley/A-volley ratio under 25%, and one third of processed signal exhibited a C-volley/A-volley ratio under 15%, demonstrating the efficiency of the process

and its ability to extract very small C-volley depression in LFP, even when they were mixed with the A-volley depression.

2 Identification of LFP - spikes relationship

2.a) LFP – spikes synchronization

Once the C-volley depression of the LFP was extracted, it was ready to be compared to the spiking activity. We extracted the C-volley part of the PSTH, by using only the spiking time within the documented C fiber latencies for trigeminal stimulation [50ms-150ms]. Once C-volley PSTH and C-volley LFP depression have been synchronized (figure 5.A), one can obviously see that the maximum of PSTH depression, around 90ms, preceded the maximum depression in the LFP, around 112ms. In addition to the LFP and the PSTH, we considered the variation of the LFP, brought by the time derivative. A closer look at figure 5.A shows that PSTH latencies fitted the variation of the LFP, and not the LFP itself, including the double peaks of the C-volley. In order to confirm that observation, latencies between maximum depression of PSTH and maximum depression of the LFP were compared to latencies between maximum depression of PSTH and maximum depression of the derivative of the LFP.

Figure 5.B shows that absolute latencies between maximum depression of C-volley PSTH and maximum depression of derivative of LFP were lower than absolute latencies between peak of C-volley PSTH and maximum depression of LFP.

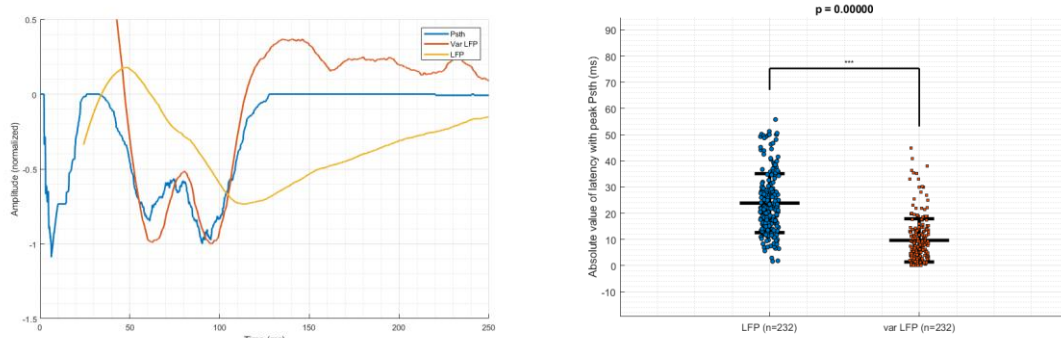


Figure 5 : (left) Example of simultaneous PSTH, LFP and variation (time derivative) of LFP for the same block of 30 stimulations. Amplitude normalized by maximum depression, versus time in ms. (right) Comparison of absolute latencies between maximum depression of PSTH, and maximum depression of LFP and derivative of LFP (N = 232, paired t-test, $p < 10^{-4}$).

Those observation suggests that the C-volley spikes were anterior to C-volley LFP depression in our measurements. Therefore, LFP depression could not be the image of presynaptic events, as the resulting depression would appear before the peak of PSTH. One suggestion can be that presynaptic events generate spikes, with a well-known mechanism, and also generate the LFP depression, but with a separate delay and mechanism. As a results such a construction could build a model with one input (presynaptic events) and two outputs (spikes and LFP). We can currently try to describe any relationship between spikes and LFP, as presynaptic event were not available in our experiment.

2.b) Spikes to LFP

Starting from the previous observation, one could start to search for a differential equation between C-volley LFP depression and C-volley PSTH. More interestingly, one could investigate a more direct relationship between spiking activity (PSTH) and LFP, by the mean of a convolutional approach. This approach was preferred because more “mechanistically” compatible.

Convolution implies that a group of neurons serves as a filter with a spike train as input, an additional smoothing step (due to propagation) and the LFP serves as the output, as showed on figure 6.

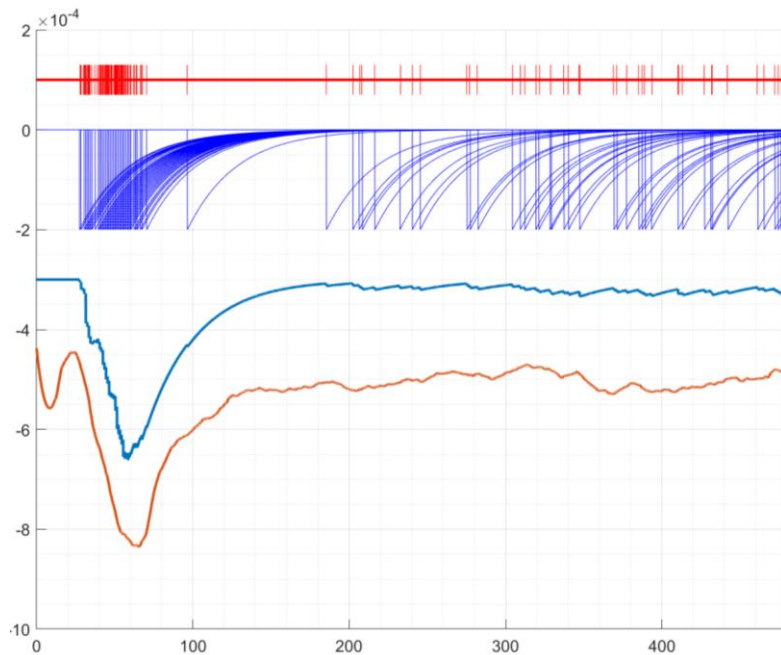


Figure 6 : illustration of the convolution process. Arbitrary amplitude on all the following lines : C-volley spike timing, convolution function as a single decaying exponential, result of the convolution (before smoothing) and C-volley LFP, against time (in ms).

Only one convolution function was tested, a single decaying exponential function, with three parameters: amplitude, decay rate and latency correction. Once those parameters were optimized, C-volley LFP were extracted from both original and computed LFP, signals were plotted and compared (see figure 7).

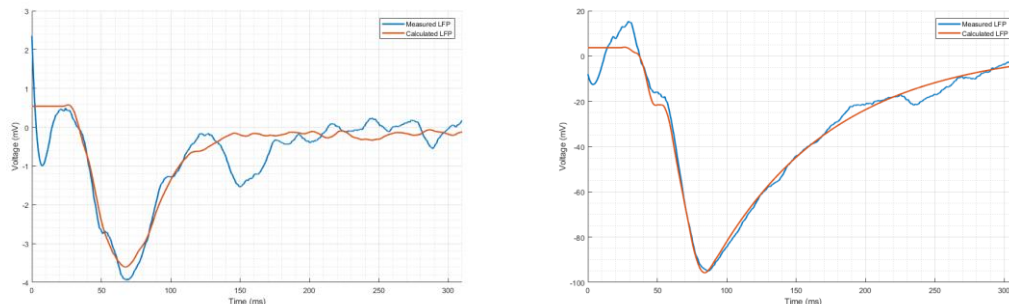


Figure 7: example of goodness-of-fit between measured C-volley LFP (in blue) and calculated C-volley LFP (in red), for a fast decaying C-volley depression (left) and a slow decaying C-volley depression (right), amplitude in mV versus time in ms.

Figure 7 shows two examples of calculated LFP from spiking pattern, one with a fast decaying C-volley depression and one with a slow decaying C-volley depression, both correctly reconstructed with the proper elementary function convoluted with the spiking pattern. In order to assess the efficiency of the approach, original and computed LFP were linearly correlated using Pearson correlation coefficient. Distribution of correlation coefficient can be seen on figure 8.

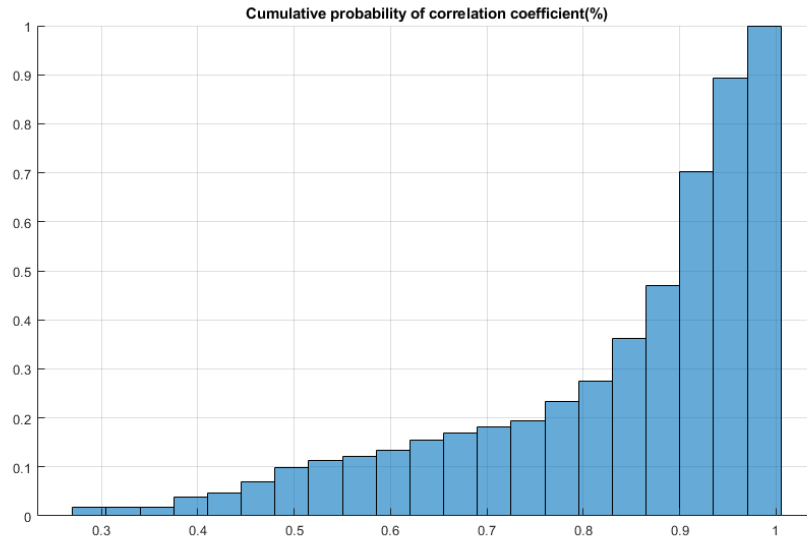


Figure 8 : cumulative distribution of correlation coefficients over all collected data, expressed in percentage

Over all collected data, 75% of all correlation coefficients were greater than 0.8, that shows an excellent correlation, and thus validating that LFP can be calculated from the spiking pattern through convolution and with the proper convolution function.

2.c) LFP to PSTH

In order to prove that the previous approach can be reversed, and that the spiking activity or PSTH can be accurately produced from the LFP. Since the LFP could be generated from the spiking pattern using convolution, the first step was to use the deconvolution, such as Wiener deconvolution or basis pursuit, but none of these method could lead to a spiking pattern that lead to the proper PSTH.

Another option was to choose a probability density function (pdf) and a spike number, generate a random volley of spikes according to that pdf, calculate the corresponding LFP using convolution method and compared than LFP to the measured LFP (see methods for details). Several pdf were tested, and the best PSD revealed to be a triple logistic function (see methods), with the following parameters:

- Central times t_1 , t_2 and t_3 in ms
- Width W in ms

The triple Logistic function allowed us to model either short duration/large amplitude C-volley or plateau-like/medium amplitude C-volley (figure 9).

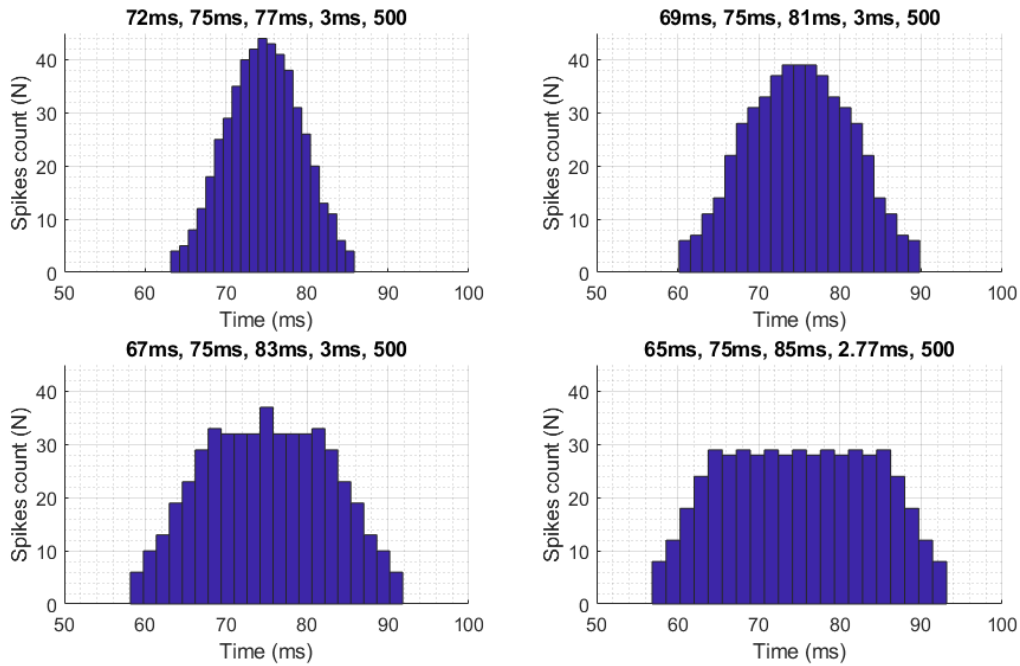


Figure 9 : examples of PSTH calculated from probability density function with from 4 different sets of parameters (T1, T2, T3, W and N), chosen to illustrate the ability to produce a PSTH with a shape from a narrow, single peak PSTH (A), to progressively wider distribution (B, C and D). Each PSTH were calculated with the same total number of spikes (N=500)

Spiking pattern produced by the method were used to calculate corresponding PSTH, and overall goodness-of-fit was assessed using Pearson coefficient on total spikes number. Resulting PSTH were very close to the actual measured PSTH (figure 10), with peak timing of PSTH and global shape very comparable, although PSTH exhibited obvious lower AUC.

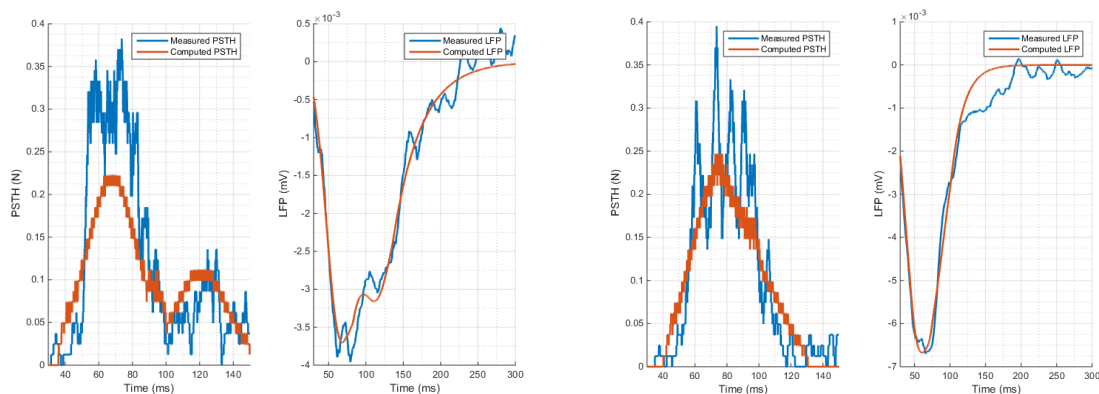


Figure 10 : A and C: examples of calculated PSTH; B and D: corresponding LFP. In the first case (A and C), the approach correctly generated the double peak in the psth (with peak at 70ms and peak at 120ms) that correspond to early and late C-volley. In the second case (B and D), the approach correctly calculated a wider, yet single peak, psth

Final performance of the calculation of spiking activity from the LFP was assessed by correlating the total number of spikes from calculation and measurement. Correlation was done in three folds: firstly, for each specimen, calculated spike number were compared to measured spike number for each stimulation session, (stimulation number ranged from 4 to 19, depending on specimen, figure 11); secondly, by correlating all

spike number from all recording all together (figure 12); thirdly, by presenting the proportion ratio after correlation for each of the 18 specimens (figure 13).

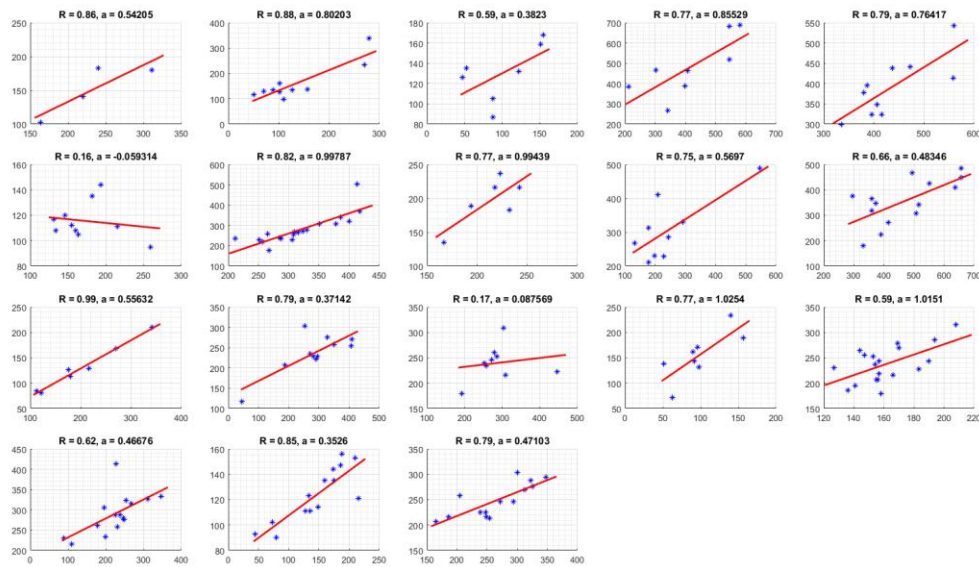


Figure 11 : calculated spike number versus measured spikes number for specimen 1 to 18 (blue dots), with linear regression (red line), Pearson correlation coefficient R and proportion ratio a.

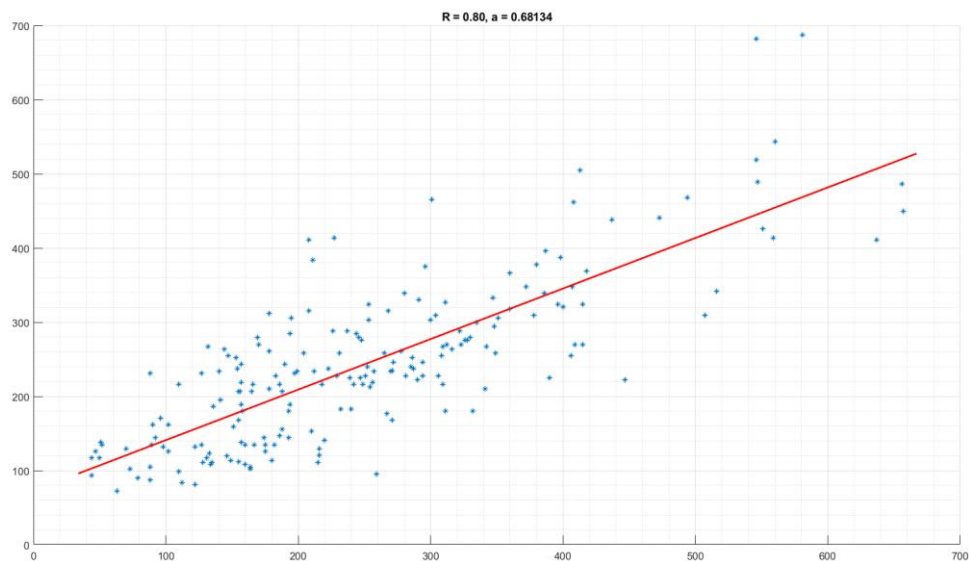


Figure 12 : calculated spike number versus measured spikes number from all recorded data (blue dots), with linear regression (red line), Pearson correlation coefficient R and proportion ratio a.

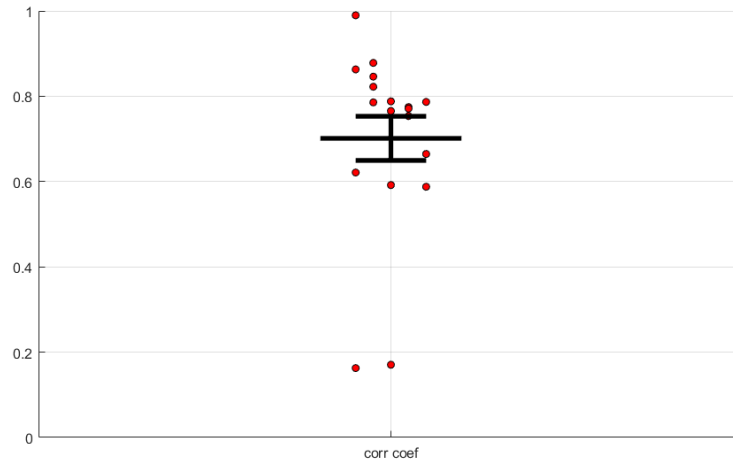


Figure 13: distribution of proportion ratio for the 19 specimens, with mean proportion ratio of 0.59

Overall, calculated spike number were highly correlated to actual measured spike number for the C-volley : the average correlation coefficient was 0.701 when calculated from the 18 specimens (figure 11) but when correlation was assessed with all data pulled together, the correlation coefficient increased to 0.8 (figure 12). It is worth noticing that the process, while highly correlated, underestimated the spike number by 40%, as showed by the slope value of the regression line, with a mean value of 0.59 (figure 13). That confirms the observations made on the AUC of the calculated psth, that seemed to be lower (figure 10).

Discussion

Power line denoising

Results showed that powerline noise can be removed even from heavily corrupted signal, in evoked condition, offline, and without the powerline reference, thanks to the nonlinear least squared approach. In addition, the proposed method does not change the low frequency content of the signal, hence the LFP should not be corrupted by the denoising process, allowing us to study it. In our case, working with nonstationary signals, very low SNR (mean SNR of 13.1dB, from -3dB to 30dB), varying noise parameters and lacking noise reference, adaptive noise cancelling was the only option. No bandstop or notch filter could be designed that came close to a noise free signal without signal distortion considering our SNR and the time delay between stimulation artefact and signal of interest. Reference free powerline noise cancelling applied to neuroscience is somehow quite recent. Comparison with other denoising process such as proposed by already published works^{27,41,44} should definitely be undergone to investigate improvement, but our denoising process appeared to be efficient enough.

Extraction and analysis of C- volley LFP

Results show that it was possible to extract the C-volley LFP even when mixed into A-volley decaying part and when the ratios C-volley depression/A-volley depression were small (see result figure 4). As a consequence, those results enable the analysis of C-volley LFP on a large combination of recording / stimulation sites : spatial proximity of the two sites, considering A and C fibers transmission speed, may generate mixed LFP depression, but is no more an issue. Other methods required to record C-volley free signals, with only the A-volley depression, i.e. with lower stimulation intensity. The A-volley-only LFP was then subtracted from the A+C volley to produce the C-volley LFP, such as previously demonstrated on sciatic nerve²⁰. Due to additional recording time that extends the whole experimentation and could jeopardize

other results, it was chosen to post process the signal instead of produce more recordings and subtract them.

Furthermore, extracting the C-volley LFP can lead to a more complex analysis than simple indicators such as maximum depression or AUC^{18-24,29,31,45,46} : C-volley LFP as presented figure 3.b exhibits a very recognizable profile. One can easily recognize the double decaying exponential curve, usually associated with EPSC⁴⁷, inside that C-volley LFP depression. Future works will investigate the meaning and interpretation of the shape of the C-volley LFP. Meanwhile, that shape will be presently studied as the image of the spiking activity of nearby neurons.

LFP and PSTH relationship

Results showed that it was possible to assess LFP ↔ spiking activity relationship, in both ways, after powerline noise removal and C evoked signal extraction, and hopefully contradict previously made prediction².

Our results confirm previous conclusions in the literature^{13,14}, concerning the relationship between PSTH, LFP and its derivative: PSTH variations correspond to the variations of the first derivative of LFP instead of the variation of the LFP itself, with spikes volley being anterior to LFP depression, confirming previous results on facial pain-evoked recording of LFP²⁵ or sound-evoked recording in auditory cortex¹¹. This suggests a kind of causality from spiking activity to LFP variation and could trigger a study based on differential equation. But without proper theoretical background to feed a proper formulation, this path was not further explored.

However, such causality, meaning spikes being linked to variation rate (derivative) of the LFP rather than LFP itself, is in conflict with all literature investigating either the spike triggered LFP or the spike-LFP phase^{48,49}, or trying to link spiking frequency to LFP state²⁷. The main difference comes from the experimental nature of the LFP itself: those studies were based on spontaneous activity whereas our work was based on evoked condition only. Indeed, evoked condition, such as cutaneous electrical stimulation, assures that a group of neurons have similar and synchronized inputs/solicitations, thus generating a deeper LFP signature that is synchronized with spiking activity. This observation is in accordance with previous studies⁹ which concluded that spikes synchronization (from evoked condition) is a key factor to explain LFP oscillations.

Considering LFP computed from spikes or PSTH calculated from LFP, recent works have investigated the relationship between spiking activity and LFP and worked on generation of firing frequency from LFP, based on Support vector Machine⁵ or least squared correlation³. Best correlation coefficient obtained through their proposed method were respectively 0.4 and 0.52 on firing rate. Our approach revealed to be more efficient, and reached a correlation coefficient of ($r = 0.7$ on spikes number). Again, such improvement can be easily explained by an evoked condition, compared to spontaneous activity: literature suggests that LFP reflects mainly a network activity, and LFP is most certainly polluted by the diversity of inputs to neurons network. Overall, the ability to recover the PSTH from the LFP only is a huge improvement for extracellular recording as it is usually accepted that LFP is easier to record than single cell activity. However, the proposed method also comes with some limitations: although we did prove that LFP could be inferred from spikes providing one find the proper convolution template, the proposed method mostly provides a way to find the proper convolution template. Further work are definitely needed to generalize the convolution template or at least provide a minimal set of functions instead of a model to be fitted. Also, the very same template was needed to infer the PSTH from the LFP and the method cannot process blindly without the template. As a consequence, inferring the PSTH from the LFP in our experimental condition would not be currently possible without previously identify the convolution template, and that builds a limitation that needs to be assessed in future works, by identifying a generic template.

In addition to those direct applications for experimental design, results could be interpreted as follow. On one hand, the LFP is often considered as a spatial integration of the neuronal activity^{2,12}, and any signature in the LFP, when associated with evoked activity, suggests that local neurons are involved with the corresponding stimulus. On the other hand, PSTH is by definition a temporal integration from several occurrences of the output of the same neuron from the stimulus. Being able to calculate the PSTH from LFP of the LFP from the PSTH suggests that evoked neuronal activity can be seen as an ergodic system⁵⁰: multiple stimulations of the same unique individual element leads to the same statistical distribution as a single

stimulation of several elements, provided they correspond to a similar stimulus area. This characteristic may be possible in our experimental condition. As a consequence, and thank to the somatotopic organization of the Sp5C, ergodicity may be a signature of both spatial organization of neurons and synchronicity. Therefore, when used on a different anatomic area, proof of non-ergodicity may reflect a different somatotopic organization.

Now, it is well known that during single cell recording, the simultaneously recorded LFP comes from surrounding neurons, up to $200\mu\text{m}^2$, and this property induces two limits of our work: firstly, and thank to ergodicity of that particular neuronal area, we could generate the LFP from spiking activity and somehow approximate the PSTH from the LFP, but we used a single convolutional function for each recording. Yet by no means should the convolution function be the same for all neurons that participate to the LFP. Therefore, our bidirectional approach did not achieve perfect reconstruction, and future work will try to include multiple convolutional functions in order to reflect the participation of several surrounding neurons to the LFP. In addition, our protocol deeply underestimate the total spikes number, by an average of 40%, whereas the corresponding LFP were correctly reconstructed. That result was assumed to come again from the uniqueness of the convolution function: the SIMPLEX algorithm worked on the probability distribution of spikes, demonstrating that large differences in PSTH produced small errors in LFP. Again, separate the spikes from different neurons and associate those with specific convolution function should help to build a process that describes the bidirectional LFP-spikes relationship. Secondly, we used a single electrode to record single cell activity and LFP and, as it was previously stated in literature², the process would definitely require multiple electrodes to properly understand the relationship between single cell activity and LFP. Not only it could lead to proper source separation to associate separate convolution function to each neuron, but it could to understand the small fluctuation in the LFP that are not generated by the evoked condition, such as during spontaneous recording.

Conclusion

We hypothesized that a bilateral relationship could exist between single cell extracellular recording and local field potential under evoked conditions in the Sp5C. Results showed that a template could be defined that generates the C-volley LFP depression, once averaged over 30 stimulations, from the C-volley spikes, once gathered from those stimulation, by convolution. In addition, the same template could be used to reverse generate the PSTH from the LFP. Limitations still exist, but the fact that temporal integration (PSTH) can infer spatial integration (LFP) describe an ergodic system, and that characteristic could lead to the signature of the somatotopic organization of the Sp5C, that could be used in other neuronal area.

Materials and methods

Animal description

Adult male Sprague-Dawley rats (250–300 g; Charles River, L'Arbresle, France) were raised at 23 ± 1 °C in plastic cages (425 x 266 x 185 mm , 2-3 rats per cage; Tecniplast, Comerio, Italy) with soft bedding and water and food ad libitum in a 12-h/12-h dark/light cycle for at least one week before experiment.

Animal experiments were performed according to the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain, the Directive 2010/63/UE of the European Parliament and the Council on the protection of animals used for scientific purpose. Protocols for animal care and use applied in this work were approved by the appropriate local committee at the University of Clermont-Ferrand-Auvergne. All efforts were made to minimize the number of animals used. All experimenters were blind to treatment conditions. Rats were randomized into treatment groups before any assessment.

Animal preparation

Animal surgery for in vivo electrophysiological recordings within the MDH were performed under 2% isoflurane (Aerane®, Baxter SAS) in a NO₂/O₂ mixture (1/3 – 2/3).

A tracheal cannula was inserted to perform artificially ventilation with a volume-controlled pump (54–55 strokes/min), and linked to a gaz monitoring system (Dragër®, Vamos, Allemagne). The level of isoflurane, O₂, N₂O and the end-tidal CO₂ (3.5–4.5%) were monitored during the entire experimental period. The carotid artery was cannulated to perform arterial pressure and heart rate monitoring with a pressure transmitter (UFI, Morro Bay, CA, USA) attached to an amplifier (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). This system is then interfaced to a computer (Cambridge Electronics Design 1401 computer interface). Finally, the jugular vein was cannulated, the animals were paralysed by an i.v. perfusion of vecuronium bromide (2.4 mg/h). Core temperature was maintained at 37 ± 0.5 °C with a homeothermic blanket system. The animals were placed in a stereotaxic frame with the head fixed in a ventroflexed position (incisor bar dropped 5 mm under the standard position) by means of an adapted metallic bar. The trigeminocervical complex (TCC) was exposed by removing the overlying musculature, atlanto-occipital membrane, dura mater and a cervical laminectomy. The dura overlying the dorsal surface of the right hemisphere and transverse sinus was exposed and flooded with aCSF. After surgery, the level of isoflurane was reduced to 0.75% and maintained at this level during the recording period. This percentage allowed a level of anaesthesia that was adequate for ethical purposes but that did not depress neuronal responses to noxious stimuli excessively.

Electrophysiological recording

Unitary extracellular recordings Glass microelectrodes (2-8 Mohm) filled with 5% NaCl containing pontamine sky blue were used to record activities within the right MDH. The electrophysiological setup was essentially as described previously (Boyer et al., 2014; Flores Ramos et al., 2017). Single-unit activities were amplified on a differential amplifier (50 Hz band-stop filter, High pass filter 10 KHz, low pass filter 300 Hz, gain 103), 50 Hz artefact was removed online with a HumBug (Quest Scientific®) and displayed on oscilloscopes (HAMEG®; Oscilloscope HM507). The activities recorded went into a window discriminator (WPI, 121 Windows discriminator) connected to a CED 1401plus interface (Cambridge Electronic Design) and a PC computer (Spike 2® version 6.16 software, CED, Cambridge, UK), which allowed sampling (50 kHz) and analysis of the spontaneous and evoked neuronal activity. The local field potential (LFP) was recorded with the same microelectrode, amplified (No band-stop filter, High pass filter 0.1 Hz, low pass filter 10k Hz, gain 102) and directly connected to a PC through CED 1401plus interface.

Mechanical noxious (pinch with forceps) and innocuous (paint brush) stimulations of cutaneous receptive fields were performed to characterize wide-dynamic range (WDR) neurons. Every neuron responding to stimuli from innocuous to noxious intensity with progressively increasing firing rates was classified as WDR neuron. Electrical stimuli (2 ms duration) were delivered to the cutaneous receptive field through two subcutaneous stainless steel needle electrodes (0.35 x 15 mm) and the thresholds for A- and C-fiber-evoked responses determined. A and C-fiber-evoked responses within poststimulus histograms were dissociated based on their latencies: responses with a latency > 30 ms were considered as C-fiber-evoked (Boyer et al., 2014; Flores Ramos et al., 2017). The receptive field of every neuron recorded was mapped on a standard rat face outlines. At the end of recording, recording site was marked by electrophoretic deposition of pontamine sky blue. After the animal was killed by injection of a lethal dose of pentobarbital, the brain was removed and fixed in a 10% formalin. 1 week later, the tissue was frozen, cut into serial 90 µm thick sections with a microtom (MICROM HM450, Microm). Recording sites (blue dye marks) were localized by microscopic examination.

Powerline noise removal

Once recordings were available as files, they were processed using homebrew code under Matlab environment (© 1994-2019 The MathWorks, Inc.).

Extracellular electrophysiological recording systems are extremely sensitive. As a result, they capture noise from several origins, and such noise exhibits brutal variation (>1s) in its characteristics, such as frequency

bandwidth, harmonics, distortion, or first and second order moments. Consequently, online denoising systems must be very reactive and show very high dynamic adaptability.

Such online systems require either specific tools (such as Humbug©) or additional construction (Wesson 2009, Stefano 2005). Without proper skills or knowledge in hardware, recording of signal is usually done with noise, and signal must be denoised offline. The most common noise is the powerline noise: signal comes with additional sinusoidal noise at 50Hz (60Hz in USA and Japan), with several harmonics. The most common way to denoise such signal is by using a notch filter. In the specific case of LFP study in evoked condition on signal, a notch filter would also remove some frequencies within the LFP range, and may bring additional oscillations from the stimulation artifact: in the case of face stimulation and Sp5C recording, the artifact is temporally very close to the neuronal response.

The proposed approach uses the Gauss-Newton algorithm (Björck, A. (1996). Numerical methods for least squares problems. SIAM, Philadelphia) on a sliding window to iteratively infer frequency, amplitude and phase for each harmonic: a small windows allows the process to stay dynamic enough to follow any changes in the characteristics of noise. Therefore, the recorded signal was modelled as follow :

$$s(t) = LFP(t) + \sigma(t) + K + \sum_{k=1}^M A_k \sin(2k\pi F_k t + \varphi_k)$$

With s the recorded signal on the time window, LFP the actual electrophysiological information i.e. the Local field Potential, σ a residual noise, K the offset, and the powerline noise composed of M harmonics: A_k the amplitude, φ_k the phase and F_k the fundamental frequency of the k^{th} harmonic. For each harmonic, let β be the vector of parameter such as $\beta = [A \ \varphi \ F]^T$. Starting values for k^{th} harmonic were $\beta^{(0)} = [RMS(s) \ 0 \ 50k]^T$, with RMS being the Root Mean Square value of recorded signal s over the time window. For the first harmonic, K was also to be calculated. β was then iteratively inferred from Jacobian matrix J and residual error r with the following equation :

$$\beta^{i+1} = \beta^i - (J^T J)^{-1} J^T r(\beta^i)$$

With the Jacobian matrix J for fundamental:

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial s}{\partial A_1} \\ \frac{\partial s}{\partial F_1} \\ \frac{\partial s}{\partial \varphi_1} \\ \frac{\partial s}{\partial K} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sin(2\pi F_1 t + \varphi_1) \\ t \cdot \cos(2\pi F_1 t + \varphi_1) \\ \cos(2\pi F_1 t + 1) \\ 1 \quad \dots \quad 1 \end{bmatrix}$$

And the Jacobian matrix J for harmonic ($k \geq 2$):

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial r}{\partial A_k} \\ \frac{\partial r}{\partial F_k} \\ \frac{\partial r}{\partial \varphi_k} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sin(2k\pi F_k t + \varphi_k) \\ t \cdot \cos(2k\pi F_k t + \varphi_k) \\ \cos(2k\pi F_k t + \varphi_k) \end{bmatrix}$$

And the stop criterion:

$$\beta^{i+1} - \beta^i < 0.01$$

For each time window [width 30ms, step of 1.5ms], noise parameters were assessed (frequency, amplitude and phase for each harmonic, and offset for the fundamental), and stored. Stimulation artifacts are dealt with by temporally suspending the denoising process during 30ms. Once the signal was analyzed, noise parameters were low pass filtered (3rd order zero phase Butterworth low pass filter at 5Hz). Then noise was reconstructed and finally subtracted from the original signal.

Spikes removal and smooth

As no previous methods⁵¹ achieved good results, spikes were removed using a 3rd order, 31 points Savitzky-Golay filter⁵². Signals were then smoothed by calculating the median value over 30 stimulations.

C-evoked LFP extraction

We used a model for the A-volley LFP signature. If looked closely, that signature is very close to a single exponential curve. Segment of signal to be processed were selected manually and four time stamps were placed : one at the max depression of the A-volley in the LFP(A), one at the beginning of the C-volley usual timing (B), one at the end of the C-volley usual timing (C), and one at the end of LFP recording (D). The (A-B) and (C-D) portions of the LFP are used as the curve to match for the algorithm, with (B-C) portion eluded, as it contains the C-volley depression. Then, once again, a non-linear least-squares approach (Newton-Gauss) was used to remove the A-volley LFP depression, in order to extract the C-volley-only LFP depression⁵³. See above for iterative steps, with the following model and Jacobian matrix:

$$s(t) = LFP_C(t) + \sigma(t) + K_0 e^{-\frac{t}{\tau}} + K_1 + a \cdot t$$

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial s}{\partial K_0} \\ \frac{\partial s}{\partial \tau} \\ \frac{\partial s}{\partial K_1} \\ \frac{\partial s}{\partial a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{-\frac{t}{\tau}} \\ \frac{K}{\tau^2} e^{-\frac{t}{\tau}} \\ 1 & \dots & 1 \\ t \end{bmatrix}$$

With s being the total LFP, LFP_C the C-volley LFP depression, σ a random noise, K_0 the amplitude of the A-volley model, τ the decay rate of the A-volley model, K_1 the offset, and a the linear drift. Stop criterion was the same as above. Once the algorithm had converged (see figure 3.A), the model was subtracted from the LFP to extract the C-volley LFP depression (figure 3.B).

Spikes to LFP relationship

Spike latencies corresponding to the 30 stimulations used to calculate the LFP were gathered to provide a binary spiking variable: a continuous vector of '0' (no spike) and '1' (spike) at the same sampling frequency than the LFP_C . That binary variable was then convoluted with a unique single exponential decaying template:

$$template(K_1, \tau, t_0, t) = K e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau}}$$

With K the amplitude of the template (usually in negative μV), τ the decay rate (in ms), and t_0 a small time delay (usually less than 1ms) representing a spike-to-LFP propagation time.

Or a unique double exponential decaying template:

$$template(K_1, \tau_1, \tau_2, t_0, K_2, t) = K_1 e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_1}} \cdot \left(1 - e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_2}}\right) + K_2$$

Let f be the function that takes the spikes binary information as input, and returns the LFP_C as output:

$$f(K_1, \tau, t_0) = SG(spikes * emplate(K_1, \tau, t_0, \mathbf{T}))$$

or

$$f(K_1, \tau_1, \tau_2, t_0, K_2) = SG(spikes * template(K_1, \tau_1, \tau_2, t_0, K_2, \mathbf{T}))$$

With (*) operator being the convolution, SG is a Savitsky-Golay filter of 2nd order and window length of 5ms, and \mathbf{T} the time vector corresponding to the recorded LFP.

We finally used the SIMPLEX algorithm⁵⁴ to find the optimal parameters $K_{1\ opti}$, τ_{opti} , $t_{0\ opti}$ that minimize the Euclidian norm of the difference between $f(K_1, \tau, t_0)$ and LFP_C , to demonstrate that we could find a unique template that transforms the spike pattern into LFP_C .

$$\begin{cases} LFP_{reconstructed} = f(K_{1\ opti}, \tau_{opti}, t_{0\ opti}) \\ \text{with} \\ K_{1\ opti}, \tau_{opti}, t_{0\ opti} = \min_{K_1, \tau, t_0} \|LFP_C - f(K_1, \tau, t_0)\| \end{cases}$$

LFP to PSTH relationship

We used the legit function (inverse of logistic function) to produce the probability distribution function (P) of spikes, with a mean value of μ and a spread value of σ , and a probability $x \in [0,1]$:

$$L_{\mu, \sigma}(x) = \mu + \sigma \cdot \ln\left(\frac{x}{1-x}\right)$$

In our use, the variable x was linearly spaced from 0 to 1, over N values, to build a vector of size N , \mathbf{X}_N . The L function was then transformed into a three variables function:

$$L(\mu, \sigma, N) = \mu + \sigma \cdot \ln\left(\frac{\mathbf{X}_N}{1-\mathbf{X}_N}\right)$$

Such L function produces a probability distribution function equals to :

$$PSD_{\mu, \sigma}(X) = \frac{e^{-\frac{X-\mu}{\sigma}}}{\left(1 + e^{-\frac{X-\mu}{\sigma}}\right)^2}$$

And illustrated in figure 14, with $\mu = 100ms$ and $\sigma = 5ms$

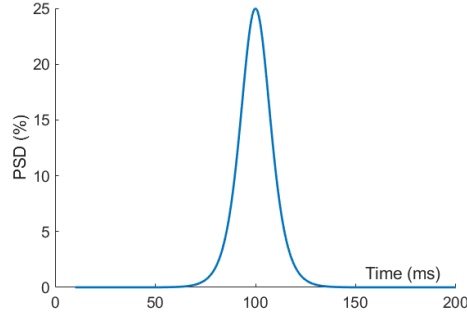


Figure 14: probability distribution function of spikes with mean value of 100ms and spread value of 5ms

To estimate the actual spike distribution from the LFP_C we built a PSD_3 composed of 3 Logit functions, such as illustrated in figure 15.

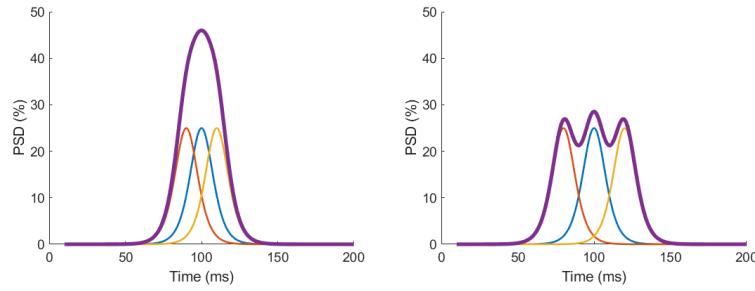


Figure 15: two examples of actual PSD used to estimate spike distribution from LFP_C , with close mean frequencies to mimic a single peak with a single large probability(A) and separate mean frequencies to mimic a plateau of distribution (B)

As a result, the final function that produces the spike distribution is :

$$L(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma, N) = \sum_{i=1}^3 \mu_i + \sigma \cdot \ln \left(\frac{X_{N/3}}{1 - X_{N/3}} \right)$$

With μ_1, μ_2, μ_3 being the mean values of the three distributions, σ the spread of the distribution, and N the number of spikes. The L function produces a distribution of spikes of different shapes, such as illustrated in figure 9 (see results). From that distribution of N spikes, a binary continuous variable was constructed, similarly to above, and the LFP was reconstituted again by convoluting the appropriate template, using the following equation:

$$LFP_{reconstructed} = g(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma, N) = SG(L(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma, N) * template)$$

With (*) operator being the convolution and SG is a Savitsky-Golay filter of 2nd order and window length of 5ms. The SIMPLEX algorithm was used to find the optimal parameter that minimized the Euclidian error between the measured LFP and the computed LFP: overall we reconstructed the PSTH by calculating the optimal spike distribution that, once convoluted with the corresponding template, fitted with LFP_C .

$$\left\{ \begin{array}{l} PSTH = histogram(L(\mu_{1\text{ opti}}, \mu_{2\text{ opti}}, \mu_{3\text{ opti}}, \sigma_{\text{opti}}, N_{\text{opti}})) \\ \text{and} \\ LFP_{\text{reconstructed}} = g(\mu_{1\text{ opti}}, \mu_{2\text{ opti}}, \mu_{3\text{ opti}}, \sigma_{\text{opti}}, N_{\text{opti}}) \\ \text{with} \\ \mu_{1\text{ opti}}, \mu_{2\text{ opti}}, \mu_{3\text{ opti}}, \sigma_{\text{opti}}, N_{\text{opti}} = \min_{\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma, N} \|LFP_C - g(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma, N)\| \end{array} \right.$$

References

1. Ray S. Challenges in the quantification and interpretation of spike-LFP relationships. *Curr Opin Neurobiol.* 2015;31:111-118.
2. Herreras O. Local Field Potentials: Myths and Misunderstandings. *Front Neural Circuits.* 2016;10:101.
3. Hall TM, Nazarpour K, Jackson A. Real-time estimation and biofeedback of single-neuron firing rates using local field potentials. *Nat Commun.* 2014;5:5462. doi:10.1038/ncomms6462
4. Jackson A, Hall T. Decoding Local Field Potentials for Neural Interfaces. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2016;PP:1-1. d
5. Rasch MJ, Gretton A, Murayama Y, Maass W, Logothetis NK. Inferring spike trains from local field potentials. *J Neurophysiol.* 2008;99(3):1461-1476.
6. Rasch M, Logothetis N, Kreiman G. From neurons to circuits: linear estimation of local field potentials. *J Neurosci.* 2009;29:13785.
7. Nauhaus I, Busse L, Carandini M, Ringach DL. Stimulus contrast modulates functional connectivity in visual cortex. *Nat Neurosci.* 2009;12(1):70-76. doi:10.1038/nn.2232
8. Ray S, Maunsell JHR. Network rhythms influence the relationship between spike-triggered local field potential and functional connectivity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2011;31(35):12674-12682. doi:10.1523/JNEUROSCI.1856-11.2011
9. Denker M, Roux S, Lindén H, Diesmann M, Riehle A, Grün S. The local field potential reflects surplus spike synchrony. *Cereb Cortex N Y N 1991.* 2011;21(12):2681-2695. doi:10.1093/cercor/bhr040
10. Geng X, Wang X, He F, et al. Spike and Local Field Synchronization Between the Pedunculopontine Nucleus and Primary Motor Cortex in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience.* 2019;404:470-483. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.01.044
11. Liu X, Zhou L, Ding F, Wang Y, Yan J. Local field potentials are local events in the mouse auditory cortex. *Eur J Neurosci.* 2015;42(6):2289-2297. doi:10.1111/ejn.13003
12. Lindén H, Tetzlaff T, Potjans TC, et al. Modeling the spatial reach of the LFP. *Neuron.* 2011;72(5):859-872. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.006
13. Zippo AG, Nencini S, Caramenti GC, Valente M, Storchi R, Biella GEM. A simple stimulatory device for evoking point-like tactile stimuli: a searchlight for LFP to spike transitions. *J Vis Exp JoVE.* 2014;(85). doi:10.3791/50941

14. Storchi R, Zippo AG, Caramenti GC, Valente M, Biella GEM. Predicting spike occurrence and neuronal responsiveness from LFPs in primary somatosensory cortex. *PLoS One*. 2012;7(5):e35850. doi:10.1371/journal.pone.0035850
15. Schouenborg J. Functional and topographical properties of field potentials evoked in rat dorsal horn by cutaneous C-fibre stimulation. *J Physiol*. 1984;356:169-192. doi:10.1113/jphysiol.1984.sp015459
16. Wall PD, Lidiérth M. Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. *J Neurophysiol*. 1997;78(2):860-871. doi:10.1152/jn.1997.78.2.860
17. Liu X, Sandkühler J. Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J Neurophysiol*. 1997;78(4):1973-1982. doi:10.1152/jn.1997.78.4.1973
18. Azkue JJ, Liu X-G, Zimmermann M, Sandkühler J. Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *Pain*. 2003;106(3):373-379. doi:10.1016/j.pain.2003.08.007
19. Yang H-W, Zhou L-J, Hu N-W, Xin W-J, Liu X-G. Activation of spinal d1/d5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J Neurophysiol*. 2005;94(2):961-967. doi:10.1152/jn.01324.2004
20. Buesa I, Ortiz V, Aguilera L, Torre F, Zimmermann M, Azkue JJ. Disinhibition of spinal responses to primary afferent input by antagonism at GABA receptors in urethane-anaesthetised rats is dependent on NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*. 2006;50(5):585-594. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.11.005
21. Zhou L-J, Zhong Y, Ren W-J, Li Y-Y, Zhang T, Liu X-G. BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Exp Neurol*. 2008;212(2):507-514. doi:10.1016/j.expneurol.2008.04.034
22. Buesa I, Urrutia A, Aira Z, et al. Depression of C fibre-evoked spinal field potentials by the spinal delta opioid receptor is enhanced in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain: involvement of the mu-subtype. *Neuropharmacology*. 2008;55(8):1376-1382. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.08.029
23. Aira Z, Buesa I, Salgueiro M, et al. Subtype-specific changes in 5-HT receptor-mediated modulation of C fibre-evoked spinal field potentials are triggered by peripheral nerve injury. *Neuroscience*. 2010;168(3):831-841. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.032
24. Drdla R, Sandkühler J. Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo. *Mol Pain*. 2008;4:18. doi:10.1186/1744-8069-4-18
25. Melin C, Jacquot F, Vitello N, Dallel R, Artola A. Different processing of meningeal and cutaneous pain information in the spinal trigeminal nucleus caudalis. *Cephalalgia Int J Headache*. 2017;37(12):1189-1201. doi:10.1177/0333102416673204

26. Melin C, Jacquot F, Dallel R, Artola A. Segmental disinhibition suppresses C-fiber inputs to the rat superficial medullary dorsal horn via the activation of GABAB receptors. *Eur J Neurosci*. 2013;37(3):417-428. doi:10.1111/ejn.12048
27. Kelly RC, Smith MA, Kass RE, Lee TS. Local field potentials indicate network state and account for neuronal response variability. *J Comput Neurosci*. 2010;29(3):567-579. doi:10.1007/s10827-009-0208-9
28. Flint RD, Lindberg EW, Jordan LR, Miller LE, Slutzky MW. Accurate decoding of reaching movements from field potentials in the absence of spikes. *J Neural Eng*. 2012;9(4):046006. doi:10.1088/1741-2560/9/4/046006
29. Tanabe M, Murakami H, Honda M, Ono H. Gabapentin depresses C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn only after induction of long-term potentiation. *Exp Neurol*. 2006;202(2):280-286. doi:10.1016/j.expneurol.2006.06.002
30. Liu XG, Sandkühler J. Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci Lett*. 1995;191(1-2):43-46. doi:10.1016/0304-3940(95)11553-0
31. Liu XG, Sandkühler J. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate or neurokinin receptors induces long-term potentiation of spinal C-fibre-evoked potentials. *Neuroscience*. 1998;86(4):1209-1216. doi:10.1016/s0306-4522(98)00107-9
32. Sandkühler J, Liu X. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *Eur J Neurosci*. 1998;10(7):2476-2480. doi:10.1046/j.1460-9568.1998.00278.x
33. Liu W-T, Han Y, Li H-C, et al. An in vivo mouse model of long-term potentiation at synapses between primary afferent C-fibers and spinal dorsal horn neurons: essential role of EphB1 receptor. *Mol Pain*. 2009;5:29. doi:10.1186/1744-8069-5-29
34. Di Stefano A, Scaglione A, Giaconia C. Efficient FPGA implementation of an adaptive noise canceller. In: ; 2005:87-89. doi:10.1109/CAMP.2005.22
35. Dobrev D, Neycheva T, Mudrov N. Digital lock-in techniques for adaptive power-line interference extraction. *Physiol Meas*. 2008;29(7):803-816. doi:10.1088/0967-3334/29/7/009
36. Wesson KD, Ochshorn RM, Land BR. Low-cost, high-fidelity, adaptive cancellation of periodic 60Hz noise. *J Neurosci Methods*. 2009;185(1):50-55. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.09.008
37. Chimene MF, Pallas-Areny R. A comprehensive model for power line interference in biopotential measurements. *IEEE Trans Instrum Meas*. 2000;49(3):535-540. doi:10.1109/19.850390

38. Li G, Zeng X, Zhou X, Zhou Y, Liu G, Zhou X. Robust suppression of nonstationary power-line interference in electrocardiogram signals. *Physiol Meas*. 2012;33(7):1151–1169. doi:10.1088/0967-3334/33/7/1151
39. Jiruska P, Cmejla R, Powell AD, Chang W-C, Vreugdenhil M, Jefferys JGR. Reference noise method of removing powerline noise from recorded signals. *J Neurosci Methods*. 2009;184(1):110-114. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.07.003
40. Dalgaard E, Auken E, Larsen JJ. Adaptive noise cancelling of multichannel magnetic resonance sounding signals. *Geophys J Int*. 2012;191(1):88-100. doi:10.1111/j.1365-246X.2012.05618.x
41. Keshtkaran MR, Yang Z. Power line interference cancellation in in-vivo neural recording. In: *2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. ; 2012:5214-5217. doi:10.1109/EMBC.2012.6347169
42. Kelly JW, Siewiorek DP, Smailagic A, Wang W. An Adaptive Filter for the Removal of Drifting Sinusoidal Noise Without a Reference. *IEEE J Biomed Health Inform*. 2016;20(1):213-221. doi:10.1109/JBHI.2014.2375318
43. Badreldin IS, El-Kholy DS, Elwakil AA. Harmonic adaptive noise canceler for electrocardiography with no power-line reference. In: *2012 16th IEEE Mediterranean Electrotechnical Conference*. ; 2012:1017-1020. doi:10.1109/MELCON.2012.6196600
44. Mohan N, Kumar S S, Kp S. An ℓ_1 -Norm Based Optimization Approach for Power Line Interference Removal in ECG Signals. In: ; 2018:319-329. doi:10.1007/978-981-10-3376-6_35
45. Aira Z, Buesa I, Gallego M, et al. Time-dependent cross talk between spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor and mGluR1 subserves spinal hyperexcitability and neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2012;32(39):13568-13581. doi:10.1523/JNEUROSCI.1364-12.2012
46. Aira Z, Buesa I, García del Caño G, et al. Transient, 5-HT_{2B} receptor-mediated facilitation in neuropathic pain: Up-regulation of PKC γ and engagement of the NMDA receptor in dorsal horn neurons. *Pain*. 2013;154(9):1865-1877. doi:10.1016/j.pain.2013.06.009
47. Clements JD, Bekkers JM. Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template. *Biophys J*. 1997;73(1):220-229. doi:10.1016/S0006-3495(97)78062-7
48. Vinck M, Battaglia FP, Womelsdorf T, Pennartz C. Improved measures of phase-coupling between spikes and the Local Field Potential. *J Comput Neurosci*. 2012;33(1):53-75. doi:10.1007/s10827-011-0374-4
49. Einevoll GT, Kayser C, Logothetis NK, Panzeri S. Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(11):770-785. doi:10.1038/nrn3599

50. Pardalos P, Principe JC, eds. *Biocomputing*. Springer US; 2002. doi:10.1007/978-1-4613-0259-9
51. Zanos TP, Mineault PJ, Pack CC. Removal of spurious correlations between spikes and local field potentials. *J Neurophysiol*. 2011;105(1):474-486. doi:10.1152/jn.00642.2010
52. Savitzky Abraham, Golay MJE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal Chem*. 1964;36(8):1627-1639. doi:10.1021/ac60214a047
53. Björck Åke. *Numerical Methods for Least Squares Problems*. Society for Industrial and Applied Mathematics; 1996. doi:10.1137/1.9781611971484
54. Lagarias JC, Reeds JA, Wright MH, Wright PE. Convergence Properties of the Nelder--Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM J Optim*. 1998;9(1):112-147. doi:10.1137/S1052623496303470

Résumé :

La répétition des crises de migraine entraîne une plasticité neuronale inadaptée et conduit à la chronicisation de la maladie. La sensibilisation des réseaux de la douleur joue un rôle important dans la transition vers les formes chroniques de la migraine. Il est reconnu que les astrocytes sont activés dans le noyau spinal caudal du trijumeau (Sp5C) en réponse à une lésion du tissu périphérique et sont impliqués dans la sensibilisation centrale. Nous faisons l'hypothèse que les astrocytes et la D-Sérine, un gliotransmetteur co-agoniste des récepteurs NMDA, participent à la sensibilisation centrale sous-jacente dans un modèle de migraine induite par un donneur d'oxyde nitrique (NO) chez le rat. En combinant des approches comportementales, immunohistochimiques, et électrophysiologiques *in vivo*, notre étude a montré le rôle de l'activité des astrocytes dans l'hypersensibilité cutanée céphalique et l'activation neuronale au sein du Sp5C. L'administration systémique répétée d'isosorbide dinitrate (ISDN), donneur de NO, induit une surexpression de p-ERK et de GFAP dans le Sp5C, une allodynie céphalique mécanique persistante et une facilitation des réponses liées à l'activation des fibres C des neurones du Sp5C. Nous démontrons pour la première fois que l'application intracisternale d'acide L- α -aminoadipique (gliotoxine) et de D-Amino-Acid-Oxidase (enzyme dégradant la D-sérine) empêche l'allodynie et la sensibilisation du Sp5C. Cet effet préventif était supprimé par l'administration de D-sérine. Nos résultats suggèrent que les astrocytes contribuent à la sensibilisation centrale du trijumeau et à l'hypersensibilité cutanée céphalique qui caractérisent la progression de la migraine. Ils montrent que l'altération de l'activité des astrocytes pourrait constituer un nouvel élément clé dans les mécanismes physiopathologiques de la migraine.

Mots clés : Migraine, Astrocyte, ISDN, Sp5C, Allodynie, D-sérine, Neurones WDR

Abstract :

Repeated migraine attacks are associated with maladaptive neural plasticity and lead to chronic headache. Sensitization of pain networks play an important role in the transition to the chronic forms of the disorder. It is increasingly recognized that astrocytes are activated in the spinal trigeminal nucleus caudalis (Sp5C) in response to peripheral tissue injury and are involved in central sensitization. Here, we hypothesized that astrocytes and D-Serine, an astroglial neurochemical and NMDA co-agonist, participate in the central sensitization underlying a NO-donor-induced migraine model in the rat. Combining behavioral, immunohistochemical and in vivo electrophysiological approaches, our study proved the contribution of astrocytes activity in cephalic cutaneous hypersensitivity and neuronal activation within the MDH. Recurrent systemic administration of isosorbide dinitrate (ISDN), a nitric oxide donor, induce an overexpression of p-ERK and GFAP in Sp5C, a persistent cephalic mechanical allodynia and facilitated C-fiber-electrically-evoked responses of Sp5C neurons. We demonstrate for first time that intracisternal application of L- α -Aminoadipic acid (gliotoxin) and D-Amino-Acid-Oxidase (D-Serine degrading enzyme) prevented allodynia and trigeminal sensitization, but this preventive effect was abolished by D-serine administration. Our results suggest that astrocytes contribute to the trigeminal central sensitization and cephalic cutaneous hypersensitivity that characterize the migraine progression. They show that alteration of astrocyte activity could be a new key element in the pathophysiological mechanisms of migraine.

Keywords : Migraine, Astrocyte, ISDN, SP5C, Allodynia, D-serine, WDR neurons